

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

**Evaluation neuer Biomarker für Endotoxämie und
Sepsis bei der Kolik des Pferdes**

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

**vorgelegt von
Svenja Lilge
Tierärztin aus Berlin**

**Berlin 2022
Journal-Nr.: 4341**

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

Evaluation neuer Biomarker für Endotoxämie und Sepsis bei der Kolik des Pferdes

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Svenja Lilge

Tierärztin

aus Berlin

Berlin 2022

Journal Nr. 4341

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. Mahtab Bahramsoltani
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

horses, colic, sepsis, toxicity, respiration, leukocytes, body temperature, calcium,
ELISA, tumor necrosis factor, interleukin 1

Tag der Promotion: 02.05.2022

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: 978-3-96729-164-3

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2022

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 2022 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Inhaltsverzeichnis..... | I |
| I. Abbildungsverzeichnis..... | III |
| II. Bilderverzeichnis..... | IV |
| III. Tabellenverzeichnis..... | V |
| IV. Abkürzungsverzeichnis..... | VI |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 2 Literatur..... | 3 |
| 2.1 Kolik..... | 3 |
| 2.2 Endotoxine..... | 4 |
| 2.2.1 Endotoxämie beim Pferd..... | 6 |
| 2.2.2 Sepsis (-Score)..... | 8 |
| 2.3 Zytokine..... | 10 |
| 2.3.1 Zytokine im Kontext einer Endotoxämie..... | 13 |
| 2.4 Matrix-Metalloproteinasen..... | 14 |
| 2.4.1 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) im Kontext der Entzündung..... | 16 |
| 2.5 Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs)..... | 17 |
| 2.6 Zusammenwirken von Zytokinen, MMPs und TIMPs im Kontext der Entzündung .. | 18 |
| 2.7 Labordiagnostik bei Pferden mit Koliksymptomen..... | 19 |
| 2.7.1 Laboranalysen von Blut/Serum/Plasma..... | 20 |
| 2.7.2 Abdominozentese..... | 22 |
| 2.7.3 Laboranalysen von Peritonealflüssigkeit..... | 23 |
| 3 Material und Methode..... | 26 |
| 3.1 Patientengut..... | 26 |
| 3.2 Allgemeine und spezielle Untersuchungen..... | 26 |
| 3.3 Anwendung des Sepsis Score..... | 28 |
| 3.4 Gewinnung des Probenmaterials..... | 29 |
| 3.5 Labordiagnostik..... | 31 |
| 3.5.1 Prinzip der ELISA Kits..... | 31 |
| 3.5.2 Durchführung der Assays..... | 33 |
| 3.6 Statistik..... | 35 |
| 4 Ergebnisse..... | 37 |
| 4.1 Sepsis Score..... | 37 |
| 4.2 MMP-2 und MMP-8..... | 39 |
| 4.3 TIMP-1 und TIMP-2..... | 40 |
| 4.4 IL-1 β and TNF- α | 41 |

| | | |
|-----|----------------------------------|----|
| 4.5 | Statistische Resultate..... | 42 |
| 5 | Diskussion..... | 44 |
| 6 | Zusammenfassung..... | 54 |
| 7 | Summary..... | 56 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 57 |
| 9 | Anhang..... | 81 |
| 10 | Publikationsverzeichnis | 89 |
| 11 | Danksagung | 90 |
| 12 | Selbstständigkeitserklärung..... | 91 |

I. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schema der Grundstruktur der LPS

Abb. 2 Schema der Beteiligung der Endotoxine an der Pathogenese des septischen Schocks

Abb. 3 Differenzierung naiver T-Zellen

Abb. 4 Typische Standardkurve für IL-1 β als Beispiel für die Equine ELISA-kits

Abb. 5 ROC Graph zur Darstellung der Sensitivität und Spezifität von TIMP-1

II. Bilderverzeichnis

Bild 1 Schieben einer Nasenschlundsonde und Ablassen von Reflux bei einem Koliker

Bild 2 sterile Punktion der Bauchhöhle eines der beprobten Pferde

Bild 3 Auffangen des Probenmaterials in einem sterilen Röhrchen

Bild 4 ELISA – Mikroplatte für MMP8

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Sepsis Score nach Breuer und Schusser

Tab. 2 Sepsis Score modifiziert nach Breuer und Schusser

Tab. 3 Spezies, Nachweisgrenze und Detektionsbereich der ELISA-kits

Tab. 4 Ergebnisse des Sepsis-Scores

Tab. 5 Ergebnisse der Konzentrationen von MMP-2 und MMP-8

Tab. 6 Ergebnisse der Konzentrationen von TIMP-1 und TIMP-2

Tab. 7 Ergebnisse der Konzentrationen von TNF- α und IL-1 β

Tab. 8 Allgemeine Daten, Therapie und Diagnose der 47 untersuchten Pferde

Tab. 9 Ergebnisse der für den Sepsis-Score relevanten Parameter

Tab. 10 Ergebnisse der makroskopischen Untersuchungen und der Laboranalysen der gewonnenen Bauchhöhlenpunktate

Tab. 11 Ergebnisse der Laboranalysen der gewonnenen Blutproben

IV. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------------|---|
| Aa. dig. palm. med. et lat. | Arteriae digitales palmares mediales et laterales |
| Abb. | Abbildung |
| AF | Atemfrequenz |
| BD | Blutdruck |
| bzw. | beziehungsweise |
| CK | Kreatinkinase |
| DIC | disseminierten intravasalen Koagulopathie |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| ECEIM | European College of Equine Internal Medicine |
| et al. | et alii |
| etc. | etcetera |
| FU Berlin | Freie Universität Berlin |
| G-CSF | granulocyte colony-stimulating factor |
| ggr. | geringgradig |
| GGT | Serum- γ -Glutamyltransferase |
| HF | Herzfrequenz |
| hgr. | hochgradig |
| Hkt | Hämatokrit |
| IBD | inflammatory bowel disease |
| IFN | Interferon |
| IKT | innere Körpertemperatur |
| IL | Interleukin |
| Jh. n. Chr. | Jahrhundert nach Christus |
| Jh. v. Chr. | Jahrhundert vor Christus |
| kDA | Kilodalton |
| k.A. | keine Angabe |
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| LPS | Lipopolysaccharide |

| | |
|--------|---|
| MCP | monocyte chemoattractant protein |
| mgr. | mittelgradig |
| µL | Mikroliter |
| min. | Minute |
| ml | Milliliter |
| mmol/l | minimol pro Liter |
| MMP | Matrixmetalloproteinase |
| n.g. | Nanogramm |
| n.m. | nicht messbar |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NSAID | nichtsteroidalen Antiphlogistika |
| O.D. | optischer Dichtebereich |
| PAF | Plättchen-aktivierender Faktor |
| PCT | Procalcitonin |
| PDE | Phosphodiesterase |
| p.g. | Picogramm |
| PMN | polymorphkernige Leukozyten |
| RES | reticuloendotheliales System |
| ROC | receiver operating characteristic |
| Tab. | Tabelle |
| TIMP | tissue inhibitors of metalloproteinases |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor |
| TP | Totalprotein |
| Treg | regulatorische T-Zellen |
| u.a. | unter anderem |
| z.B. | zum Beispiel |
| z.T. | zum Teil |

1 Einleitung

Der Symptomkomplex der "Kolik" umfasst eine Reihe von Organerkrankungen, die sowohl eine intra- als auch extraintestinale Ätiologie aufweisen können (Abutarbush et al. 2005; Steel und Gibson 2002; Schramme 1995). Sie ist der häufigste Notfall in der Pferdemedizin und eine Hauptursache für Morbidität und Mortalität beim Pferd (Ireland et al. 2011; Tinker et al. 1997a; Tinker et al. 1997b).

Lassen sich Kolik-Symptome auf eine Erkrankung des Gastrointestinaltraktes zurückführen, sind sie im Falle eines Ileus in der Regel mit Hypoperfusion, Ischämie sowie erhöhter Permeabilität der Darmwände assoziiert und resultieren häufig in Endotoxämie und Sepsis (Barton und Collatos 1999; King und Gerring 1988; Meyers et al. 1982). Gelangen dabei Endotoxine in die Bauchhöhle, reagieren die residenten, peritonealen Makrophagen und Mesothelzellen mit der Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren (Zytokinen) (Tadros und Frank 2012; Davidson et al. 2002; Barton und Collatos 1999). Im Zuge der Entzündungskaskade und Schädigung der Gewebe des Verdauungstraktes kommt es zudem zur Aktivierung sowie Sezernierung proteolytischer Enzyme, den sogenannten Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), durch Entzündungs- und Strukturzellen (Barton et al. 2021; Barton et al. 2019b; Fugler et al. 2013; Arosalo et al. 2007). Diese MMPs vermögen unter anderem die Komponenten der extrazellulären Matrix (Kollagen, Gelatin, Elastin, Laminin, Fibronectin, Vitronectin, Proteoglykane etc.) abzubauen (Tayebjee und Lip 2007; Pugin et al. 1999). Bei endotoxämischen Pferden (z.B. aufgrund eines Strangulationsileus) ist anzunehmen, dass es zu einem Ungleichgewicht zwischen den aktiven Matrix-Metalloproteinasen und ihren Inhibitoren, den „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMPs), kommt (Barton et al. 2021; Barton et al. 2019b; Fugler et al. 2013; Arosalo et al. 2007). Durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren versucht das Immunsystem diese pathologischen Vorgänge zu regulieren. Die Quantifizierung solcher Mediatoren und Enzyme birgt somit das Potenzial, einen bedeutenden Beitrag zur diagnostischen und prognostischen Genauigkeit bei der Einschätzung des Schweregrades von Koliken zu leisten (Barton et al. 2021; Barton et al. 2019b; Fugler et al. 2013; Arosalo et al. 2007).

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit soll daher bei Pferden mit Kolik-Symptomen unterschiedlichen Schweregrades das Vorkommen verschiedener Entzündungsmediatoren und Enzyme (Zytokine, MMPs, TIMPs) sowohl im Plasma als auch Bauchhöhlenpunktat mit einem klinischen Scoring-System für Sepsis abgeglichen werden. Ziel ist es, den diagnostischen und prognostischen Wert der Zytokine IL-1 β und TNF α , der Matrix-

Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-8 sowie deren Proteinaseinhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 bei Pferden mit akuten abdominalen Schmerzen zu ermitteln.

Die erste zu untersuchende Forschungshypothese lautet, dass die erhöhte Permeabilität der Darmwände im Zuge eines Kolikgeschehens zu einer durch gramnegative Bakterien aus dem Gastrointestinaltrakt verursachten Endotoxämie bei Equiden führt, welche quantifizierbare Erhöhungen der Aktivitäten von Zytokinen im Plasma oder Bauchhöhlenpunktat der betroffenen Pferde bewirkt.

Die zweite Hypothese besteht in der Annahme, dass Strangulationen bzw. Darmverschlüsse bei kolikenden Pferden aufgrund von elastolytischen und kollagenolytischen Dysbalancen Fibrosierungen des Darms verursachen, die sich in der vermehrten, messbaren Produktion von Matrix-Metalloproteinasen manifestieren.

2 Literatur

2.1 Kolik

Der aus dem Griechischen stammende Begriff "kwliko" wurde vermutlich bereits ein Jh. v. Chr. von Parasmus, einem griechischen Schriftsteller, im Zuge der Unterscheidung verschiedener Krankheitsformen beim Rindvieh verwendet. Aufgegriffen wurde diese Begrifflichkeit im ersten Jh. n. Chr. von Lucius Junius Moderatus Columella, einem römischen Schriftsteller für Landwirtschaft, als „ventris et intestinorum dolor“ also „Schmerz der Baueingeweide“ (Hecker 1829). „Koliken“, als Symptomkomplex für starke Abdominalschmerzen, sind die häufigsten Notfälle in der Pferdemedizin. Durchschnittlich erkranken 4 bis 10% eines Pferdebestands einmal pro Jahr an einer Kolik. 10 bis 15% der Kolikerkrankungen sind Rezidive mit zum Teil mehreren Inzidenzen pro Jahr bei einem einzelnen Patienten. Die Mortalitätsrate von Pferden mit einer Kolik liegt bei 0,7% (Ireland et al. 2011; Traub-Dargatz et al. 2001; Hillyer et al. 2001; Tinker et al. 1997a; Tinker et al. 1997b; Kaneene et al. 1997). Nach Einlieferung in eine Klinik liegt die Überlebensrate der betroffenen Tiere im Durchschnitt bei knapp 70 % (Christophersen 2014). Die Ursache für eine Kolik ist meistens im Verdauungssystem des Pferdes zu finden. Gastrointestinale Kolikursachen können nach ihrer anatomischen und funktionellen Ätiologie in eine Obstipation, Obturation, Strangulation, Enteritis, Ulzeration, einen thrombotisch-embolischen Infarkt oder Ileus unterteilt werden. In etwas selteneren Fällen, wie bei Erkrankungen der Niere, Leber, Gebärmutter oder des Bauchfells, muss auch eine extraintestinale Genese in Betracht gezogen werden (Abutarbush et al. 2005; Steel und Gibson 2002; Schramme 1995).

Obwohl Ursache, Verlauf und Schweregrad von Koliken stark variieren können, ist der Erkrankungskomplex der Kolik in seiner Gänze als die häufigste Todesursache von Equiden, abgesehen von Altersschwäche, zu betrachten. Die Sterblichkeitsrate von an Kolik-Symptomen leidenden Pferden liegt bei bis zu 6,7 %. Todesursache ist dabei vor allem entweder eine Magenruptur, Läsionen durch Strangulation oder eine Enteritis (Tinker et al. 1997a; Tinker et al. 1997b; Tinker 1995).

7-10% der Kolikpatienten, die einem Tierarzt vorgestellt werden, benötigen letztendlich eine chirurgische Versorgung (Proudman 1992). Eine gründliche Evaluierung des Schweregrades der Kolik des vorgestellten Patienten ermöglicht die frühzeitige Entscheidung zur potenziell lebensrettenden chirurgischen Intervention (Cook und Hassel 2014).

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). Pferde sind als „Symbiontenverdauer“ auf eine bakterienreiche Darmflora angewiesen. Während im Dünndarm für den Aufschluss der Futtermittel vornehmlich Verdauungsenzyme aus körpereigener Produktion verantwortlich sind, findet in Kolon und Zäkum die mikrobielle Fermentation von Rohfaser statt. Dabei kommt es zu einem Abbau von Cellulose durch Enzyme, die von Bakterien gebildet werden (Moore und Dehority 1993; Gibbs et al. 1988). Erkrankt ein Pferd nun an einer gastrointestinalen Strangulation, beginnt ein fataler Symptomkomplex aus intestinaler Hypoperfusion, Ischämie und erhöhter Permeabilität der Darmwände, welcher in einem Übertritt von gramnegativen Bakterien und den mit ihnen assoziierten Endotoxinen aus dem geschädigten Intestinaltrakt in den Körperkreislauf resultiert (King und Gerring 1988).

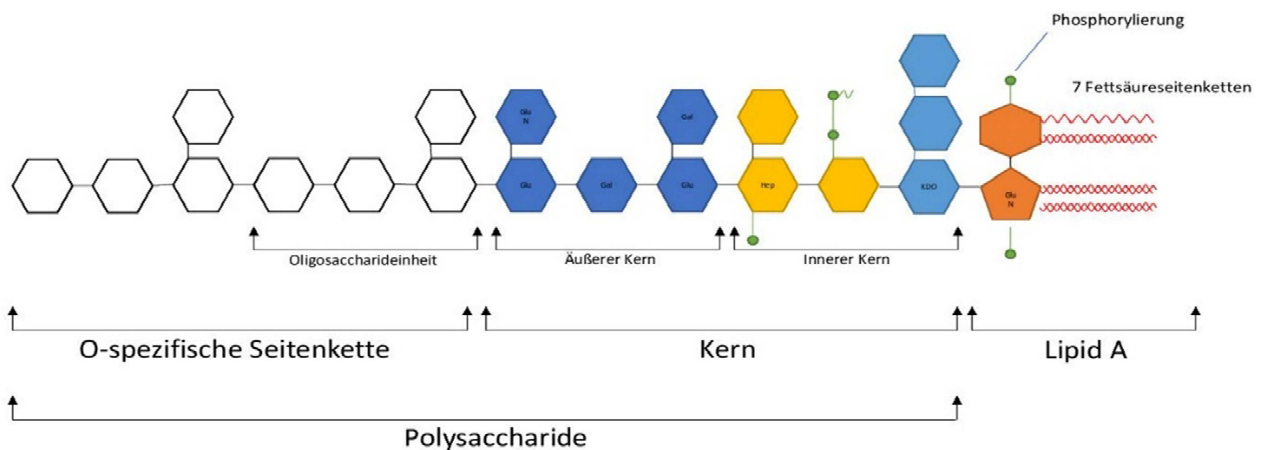
2.2 Endotoxine

Die Geschichte der Endotoxine geht zurück bis in das Jahr 1892. Ein Wissenschaftler des Robert Koch Institutes in Berlin, namens Richard Pfeiffer, veröffentlichte damals eine Forschungsarbeit über seine Untersuchungen des Cholera Giftes. Er fand heraus, dass Cholera Bakterien zwei Arten von Toxinen produzieren: das bereits bekannte, hitzelabile Exotoxin und ein bis dato unbekanntes „Gift“, welches sich als Bestandteil der Zellmembran der Bakterien entpuppte und daher in Abgrenzung „Endotoxin“ genannt wurde. Mit genauerer Erforschung der chemischen Struktur des entdeckten Moleküls erhielt es wegen seiner Zucker- und Lipideinheiten den Namen LPS (Lipopolysaccharid) (Pfeiffer 1892).

Endotoxine stellten sich als Zellwandbestandteile der äußeren Membran gramnegativer Bakterien heraus (Raetz 1990). Als einer von mehreren Schutzmechanismen gegen die zelluläre Immunantwort des befallenen Organismus sind sie eklatanter Bestandteil der Überlebensstrategie dieser Bakterien (Rietschel und Brade 1992). Für den Wirtsorganismus spielen sie eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Infektionen, Sepsis und Schock. Geringe Mengen an Endotoxinen im Körperkreislauf können durch ihre immunstimulierende Wirkung allerdings auch einen positiven Effekt auf den Gesundheitsstatus ihres Wirtes ausüben (Holst et al. 1996).

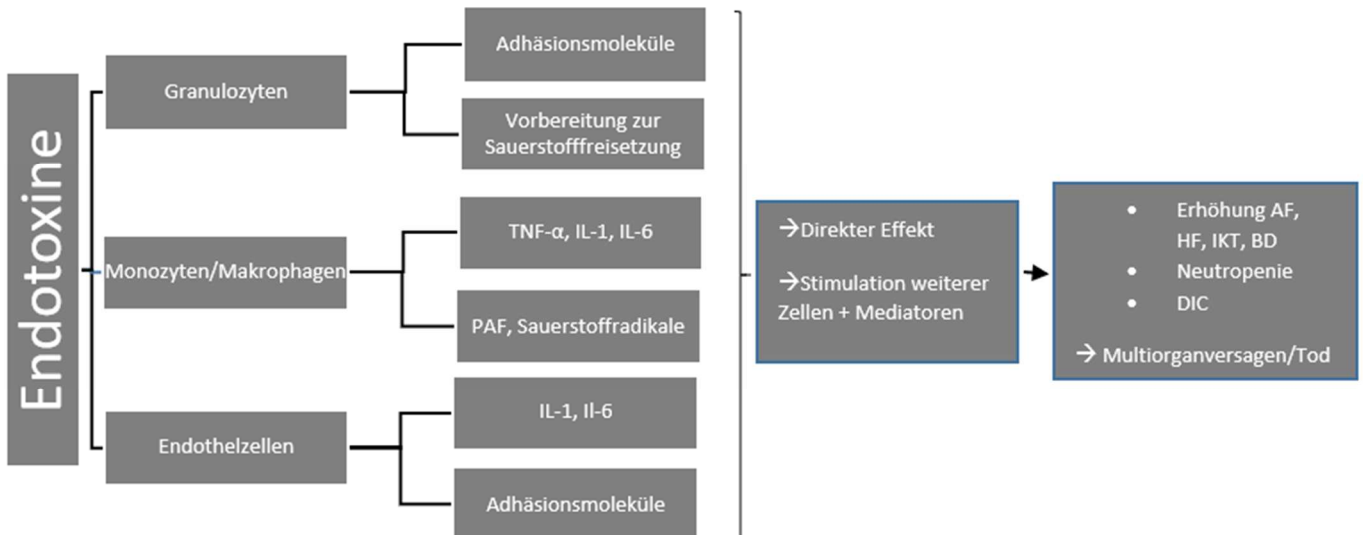
Die genaue biochemische Struktur der LPS fügt sich aus drei miteinander verbundenen Teilbereichen zusammen: die relativ unspezifische Kernregion mit mindestens einer 2-Keto-3-desoxy-octonat- Gruppe, das daran gebundene, variable Polysaccharid (O- spezifische Kette), welches aus bis zu 50 sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten besteht, sehr charakteristisch für sein jeweiliges Bakterium ist und eine hohe antigenische Eigenschaft besitzt, sowie das innere Lipid A (siehe Abb. 1). Letztgenanntes ist der am wenigsten variable Anteil des Moleküls und verantwortlich für dessen endotoxische Aktivität (Helander et al. 1988; Galanos et al. 1985).

Abb. 1 Schema der Grundstruktur der LPS (modifiziert nach Silverman und Ostro 1999; Rietschel et al. 1985)



Der Wirkmechanismus der Endotoxine erfolgt über eine Stimulation der Wirtszellen. Deren Aktivierung wird durch das Binden des LPS an spezifischen Membranproteinen vermittelt. Durch diese Rezeptor-medierte Interaktion bringen die Endotoxine vor allem Monozyten und Makrophagen, aber auch Endothelzellen, neutrophile Granulozyten und Myozyten der glatten Muskulatur dazu, endogene Mediatoren zu produzieren (Wright 1991; Freudenberg et al. 1986). Die eingeleitete Signalkaskade führt so unter anderem zur Freisetzung von bioaktiven Lipiden wie Thromboxan A2 sowie Plättchen-aktivierendem Faktor (PAF), Sauerstoffverbindungen wie Stickstoffmonoxid (NO) und vor allem Proteinen wie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin- 6 (IL-6) und Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α). Große Mengen an Endotoxinen im Kreislauf tragen so direkt oder indirekt über die aktivierten Zielzellen und deren Synthese von Entzündungsmediatoren zur pathophysiologischen Entstehung von septischen Krankheitsgeschehen bei (siehe Abb. 2) (Schletter et al. 1995).

Abb. 2 Schema der Beteiligung der Endotoxine an der Pathogenese des septischen Schocks (modifiziert nach Schletter et al. 1995)



2.2.1 Endotoxämie beim Pferd

Die Endotoxämie tritt beim Pferd als Begleiterscheinung schwerer Grunderkrankungen wie Enteritiden, Metritiden, Nachgeburtsverhalten, gastrointestinale Strangulationen, bakterielle Pneumonien sowie bei einer Kolitis, Peritonitis, bakteriellen neonatalen Sepsis oder einem postoperativen Ileus auf (Sheats 2019; Roy et al. 2017; Roy 2004; Moore und Morris 1992).

Die Ursache für das Zirkulieren der LPS im Körperkreislauf kann dabei endogener Natur (in der Regel durch einen Austritt der Endotoxine aus dem Gastrointestinaltrakt) oder auf eine exogene Infektion mit gramnegativen Bakterien zurückzuführen sein (Werners et al. 2005).

Eine Kolik ist der häufigste Auslöser von Endotoxämien beim Pferd (Sykes und Furr 2005; Roy 2004; Morris 1991). Bei verstärkter Proliferation gramnegativer Bakterien oder Auflösung ihrer Zellwand werden Endotoxine freigesetzt (Morris 1991). Da Pferde bei ihrer Verdauung auf bakterielle Symbionten angewiesen sind, ist der Magen-Darm-Trakt von ihnen reich an entsprechenden Prokaryonten (Garret et al. 2002). Verschiedene Mechanismen, wie beispielsweise die Barriere aus Epithelzellen der Mukosa, verhindern unter physiologischen Bedingungen deren Verlassen des Gastrointestinaltrakts. Kommt es nun aufgrund von Strangulationen oder Verlagerungen zu einer Minderdurchblutung betroffener Darmabschnitte, wird deren Permeabilität erhöht und Endotoxine können in den systemischen

Kreislauf gelangen (Werners et al. 2005). Ein weiterer Schutzmechanismus gegen die Toxine der gramnegativen Bakterien sind Antitoxin- Antikörper und Kupferzellen aus der Leber. Diese hepatischen Makrophagen gehören zu den Nicht-Parenchymalzellen und verkörpern ungefähr 80-90% der Gewebsmakrophagen des RES (Reticuloendotheliales System). Zu ihren wichtigsten Aufgaben zählen die Phagozytose, Bakterienabtötung und Zytokinproduktion (Decker 1990). Durch die Aufnahme von aus der Bauchhöhle in den Körperkreislauf gelangter Bakterien verhindern Kupfer-Zellen, dass Endotoxine aus abdominalen Infektionen die systemische Zirkulation erreichen. Diese Arbeit führen sie nicht nur für das portalvenöse Blut aus. Kupfer-Zellen kommen ihrer „Reinigungsfunktion“ auch im systemischen Kreislauf nach. Intravenös appliziertes Endotoxin wird nahezu ausschließlich von Kupfer-Zellen aufgenommen (Ebker 2017). Bei entsprechend schweren Koliken werden Kupfer-Zellen in ihrer Funktion als Makrophagen überfordert und schaffen es nicht mehr, Sepsis und Endotoxämie zu verhindern (Burrows 1981).

Die Auswirkungen der Endotoxämie sind vielfältig. Am stärksten betroffen zeigt sich vor allem das Herz-Kreislaufsystem, aber auch Symptome wie Fieber, arterielle Hypoxämie und akute abdominale Schmerzen sind typische Indikatoren (Suffredini et al. 1989; Burrows 1981). Dementsprechend konzentriert sich die Therapie endotoxämischer Pferde vor allem auf das kreislaufstabilisierende Intensivmanagement mit intravenösen Infusionen (kristalloid, kolloid, hyperton) und die Verabreichung von nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAIDs) sowie gegebenenfalls Antibiotika (Sykes und Furr 2005). Unter den zur Verfügung stehenden NSAIDs eignet sich die Gabe von Flunixin-Meglumin besonders gut. Dieser nicht selektiver COX Inhibitor bewirkt eine signifikante Reduktion von Thromboxan B₂, Laktat und den klinischen Zeichen einer Endotoxämie (Semrad und Moore 1987).

Je nach individuellem Krankheitsverlauf kann außerdem die Verabreichung von Polymyxin B, ein kationisches Polypeptid, das in niedriger Dosierung an den Lipid A Part der LPS bindet und Einfluss auf die klinischen Anzeichen einer Endotoxämie, Leukozytenanzahl, Thromboxan B₂, Prostaglandin F₁ sowie verschiedene Zytokine nimmt, therapeutisch indiziert sein (Barton et al. 2004; Cooperstock 1974). Die subkutane Injektion von niedermolekularem Heparin wird prophylaktisch zur Verhinderung von Koagulopathien sowie Hufreihen bei (operierten) Kolikern eingesetzt. Zusätzlich reduziert sie eine exzessive Fibrinablagerung und trägt so zur Vermeidung von abdominalen Verklebungen bei (de la Rebière de Pouyade et al. 2009; Feige et al. 2003). Durch die Gabe von antiendotoxischem Hyperimmunplasma verspricht man sich eine Neutralisierung freier Endotoxine, Bindung der LPS an der intakten Bakterienoberfläche durch die Antikörper sowie Aktivierung des Komplement-Systems inklusive einer leichteren Erkennung der Antigen-Antikörper-Komplexe durch Phagozyten (Lischka 1987). Des Weiteren kann bei der tierärztlichen Versorgung von endotoxämischen Kolikern Dimethylsulfoxid

(DMSO), welches als Radikalfänger fungiert und der Entstehung von Fieber durch die LPS entgegenwirkt, als Therapiemöglichkeit in Betracht gezogen werden (Kelmer et al. 2008). Die Anwendung von Pentoxifyllin, einem unspezifischen PDE-Inhibitor, der die Blutviskosität reduziert und die Sauerstoffversorgung von Gewebe verbessert, empfiehlt sich in Kombination mit Flunixin-Meglumin, da eine synergistische Gabe der beiden Medikamente durch Endotoxine ausgelöste hämodynamische Effekte besser reduziert, als wenn die Präparate einzeln gegeben würden (Barton et al. 1997; Baskett et al. 1997).

Neuere Forschung beschäftigt sich mit der Verabreichung von Anti-Tumor Nekrose Faktor – Antikörpern, Insulin, Detergentien sowie aktiviertem Protein- C zur Therapie von Pferden mit Endotoxämien (Sykes und Furr 2005).

2.2.2 Sepsis (-Score)

Eine Septikämie ist eine systemische, entzündliche Reaktion des Organismus auf eine Infektion (Bone et al. 1992). Die Sepsis auslösende Infektion bei Pferden mit beispielsweise strangulierenden Darmläsionen findet über die entzündete, hypoxische, intestinale Mukosa mit der Folge einer Endotoxämie statt (Morris 1991). Zur Einschätzung des Schweregrads einer solchen Sepsis bei Equiden entwickelten Breuer und Schusser 2012 einen Septikämie- Score bestehend aus 16 Parametern (elf klinischen und fünf labormedizinischen) mit insgesamt 42 zu vergebenen Punkten für jeden ihrer 1836 untersuchten Kolikpatienten (siehe Tab. 1). Sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität des Scores zur Bewertung der systemischen Entzündung als Reaktion auf die Kolikursache konnten dabei statistisch überzeugen (Breuer und Schusser 2012). Einen Zusammenhang zwischen aufgetretenen Septikämien mit letalem Ausgang und der Konzentration verschiedener Interleukine im Plasma (IL-6, IL-8, IL-10) konnte 2012 in der Humanmedizin von Andaluz-Ojeda nachgewiesen werden (Andaluz-Ojeda et al. 2012). Matsumoto et al. bestätigten 2018 die Bedeutung der Zytokine IL-6, IL-8, MCP-1 und IL-10 als wichtigen prognostischen Faktor bei der Bewertung des Schweregrades einer Sepsis in der akuten Phase (Matsumoto et al. 2018).

Tab. 1 Sepsis Score 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 der Aa. dig. palm. med. et lat. | 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 |

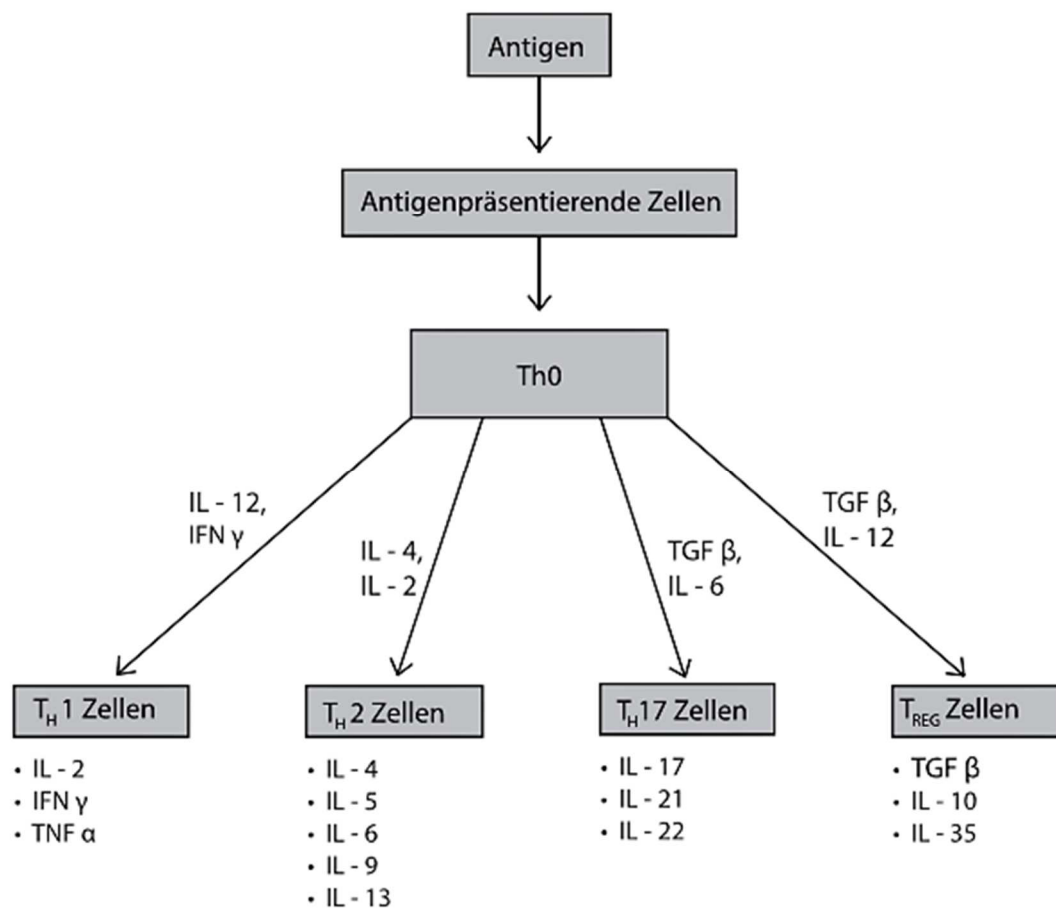
2.3 Zytokine

Zytokine sind kleine Nichtstrukturproteine (Polypeptide oder Glykoproteine) mit einer geringen molekularen Masse von weniger als 30kDA und einer kurzen Halbwertszeit im Blut sowie in der extrazellulären Flüssigkeit (Cavaillon 2015; Dinarello 2007). Sie fungieren als interzelluläre Botenstoffe und medieren die komplexe Interaktion von hämatopoetischen, lymphatischen, pro- und antiinflammatorischen Zellen mit dem Ziel der Aufrechterhaltung eines kompetenten

Immunsystems (Holtmann und Resch 1995). Dabei spielen sie eine entscheidende Rolle unter anderem bei der Immunzellendifferenzierung, bei Entzündungsgeschehen, der Angiogenese, Tumorgenese, der Neurobiologie oder viralen Pathogenese, worin sich ihr prognostischer, diagnostischer oder auch therapeutischer Wert als Biomarker in der klinischen Medizin begründet (Gulati et al. 2016).

Die Erforschung der Zytokine geht zurück auf die Entdeckung des Interferons (IFN) durch Isaacs und Lindemann in der Mitte des vorherigen Jahrhunderts (Isaacs und Lindemann 1987).

Über 200 verschiedene Zytokine wurden seitdem identifiziert und entweder nach ihrer Sekretion oder Produktion durch T-Zellen kategorisiert. Obwohl viele Zellen die Fähigkeit haben, Zytokine herzustellen, gehen drei Untergruppen zurück auf die durch ihre Produktion durch T- Zellen definierte Klassifizierung (siehe Abb. 3). Zytokine der ersten Kategorie, wie IFN- γ , IL-2, IL-15 oder Lymphotoxin (TNF- β), werden von Th1 Zellen produziert. Th2 Zellen stellen Zytokine der zweiten Kategorie, wie IL-4, IL-5, IL-6, IL- 9 oder IL-13 her (Mosmann und Coffman 1989; Romagnani et al. 1994). Das IL-10 wird sowohl von Th1 als auch Th2 - Zellen produziert (o' Garra und Viera 2007) und das dritte Zytokin- Profil geht zurück auf die Produktion durch Th17- Zellen, welche IL-17, IL-17F, IL- 22, IL-25, IL- 6, TNF- α und einige IFN- γ herstellen, oder regulatorische T-Zellen (Treg), welche IL-10, IL-5, IL- 2, IFN- γ und TGF- β produzieren (Zidek et al. 2009).

Abb. 3 Differenzierung naiver T-Zellen (modifiziert nach Gulati et al. 2016)

Die durch ihre Sekretion definierte Nomenklatur unterteilt Zytokine in Lymphokine, welche die Immunantwort regulieren, proinflammatorische Zytokine, welche Entzündungsprozesse verstärken und aufrechterhalten, Chemokine, welche chemotaktisch auf Entzündungszellen wirken, antiinflammatorische Zytokine, welche die Immunantwort negativ modulieren, und Wachstumsfaktoren (growth factors), welche das Zellüberleben fördern und zu strukturellen Veränderungen beispielsweise in den Atemwegen führen (Gulati et al. 2016; Barnes 2008).

Mit der Ausnahme von roten Blutzellen haben praktisch alle Zellen die Eignung, Zytokine zu produzieren oder Informationen durch sie zu erhalten. Ihre Fähigkeiten zur Redundanz (mehrere Zytokine vermögen den gleichen Effekt auszulösen) und zum Pleiotropismus (ein Zytokin kann an verschiedenen Zielzellen binden) geben dem Immunsystem dabei eine gewisse funktionelle Sicherheit (Ozaki und Leonard 2002). Durch die Koordinierung von T-

Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen haben Zytokine einen großen Einfluss auf die Immunfunktion und regulieren direkt oder indirekt die Genexpression verschiedener Zellen indem sie entsprechende Signalkaskaden initiieren. Da die spezifischen Rezeptoren an den Membranen der Zielzellen eine hohe Affinität zu „ihren“ Zytokinen aufweisen, genügen picomolare Konzentrationen, um entsprechende biologische Effekte zu bewirken (Miyazawa et al. 2002).

Besonders bei der Entstehung von Entzündungen präsentieren sich die Zytokine dabei durchaus als zweischneidiges Schwert für den Betroffenen, da proinflammatorische Zytokine eine große Rolle bei der Entwicklung von Gewebeerstörung spielen (La Cava und Sarvetnick 1999). Ist die Entzündungskaskade erstmal eingeleitet, verstärken Zytokine ihre eigene Produktion mittels autokriner Induktion oder interagieren mit anderen Entzündungsmediatoren wie den Komplementfaktoren C1s und C1r, wodurch sie zu einer Ausweitung des Entzündungsprozesses beitragen (Wilson et al. 2002). Die Gewebeerstörung und Entzündungsreaktion führt zu einer Aktivierung von Nozizeptoren (Schmerzrezeptoren), welche ihrerseits mit dem Entzündungsinfiltrat interagieren (Julius und Basbaum 2001). Zu Beginn eines entzündlichen Prozesses werden endogene hyperalgetische Mediatoren (inklusive der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 und TNF- α), Nervenwachstumsfaktoren und Prostaglandine sowie Bradykinin produziert (Cunha und Ferreira 2003). Im Gegenzug kommt es zur Aktivierung analgetischer Mechanismen. Immunzellen produzieren Opioidpeptide wie Endorphine, Enkephaline und Dynorphine. Diese werden nun bei Stimulation durch das IL-1 oder den Corticotropin-Releasing-Faktor lokal im entzündeten Gewebe freigesetzt. Die Opioid-vermittelte Analgesie, ausgelöst durch Bindung an Rezeptoren der peripheren sensorischen Neuronen, nimmt während des Entzündungsgeschehens stetig zu (Stein 2003; Stein et al. 1990). Unterstützt wird dieser Prozess durch die Bildung von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-4, IL-10, IL-13 oder IL-1ra, welche die Wirkung der anfänglich produzierten Entzündungsmediatoren mindern. (Entzündungs-)Schmerz ist demnach ein Produkt aus dem Zusammenspiel des Nervensystems mit seinen chemisch beziehungsweise mechanisch aktivierten Nozizeptoren und des Immunsystems mit seinen entzündungsrelevanten Mediatoren (Rittner und Stein 2005).

2.3.1 Zytokine im Kontext einer Endotoxämie

Die mit der Kolik assoziierte Endotoxämie induziert die Freisetzung von Zytokinen aus Makrophagen und Monozyten (Barton und Collatos 1999). Werden Endotoxine in vitro in

Kontakt mit peritonealen Makrophagen und Blutleukozyten von Pferden gebracht, reagieren diese mit der Ausschüttung von beispielsweise TNF- α und IL-6 (MacKay et al. 1992; Morris et al. 1990a). Auch nach intravenöser Verabreichung von Endotoxin-Infusionen bei Pferden konnten ein bis vier Stunden später vermehrte Aktivitäten von TNF- α und eineinhalb bis fünf Stunden später von IL-6 im Serum gemessen werden (Morris et al. 1992; MacKay et al. 1991; Morris et al. 1990a; Morris et al. 1990b). Diese proinflammatorischen Mediatoren (vor allem Interleukin-6 und die im Rahmen dieser Promotionsarbeit quantifizierten Zytokine Interleukin-1 β und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha) stimulieren nun ihrerseits die Synthese von Akute-Phase-Proteinen, welche das Entzündungsgeschehen mitbestimmen und so - im Zusammenwirken mit den Zytokinen - mittelfristig zu kardiovaskulären sowie gastrointestinalen Dysfunktionen, der Aktivierung des Komplementsystems, Organversagen sowie zum Tod führen können (Epstein et al. 2016; Pugin et al. 1999).

Auf der anderen Seite bewirkt dieser kausale Mechanismus zwischen Endotoxämie und Zytokinexpression aber auch, dass mittels quantitativer Bestimmung entsprechender Zytokine die Genauigkeit von Diagnose, Behandlung und Prognose bei Patienten mit Sepsis/Endotoxämie verbessert werden kann. Ein derartiges Vorgehen ist sowohl für septische Fohlen als auch für adulte Pferde mit neurologischen Erkrankungen wie Herpes sowie gastrointestinal-entzündlichen Krankheitsbildern wie der Inflammatory Bowel Disease (IBD) beschrieben (Tadros und Frank 2012; Pusterla et al. 2006a; Pusterla et al. 2006b; Davidson et al. 2002). Einen Zusammenhang zwischen Endotoxinen, Zytokinen und akuten abdominalen Erkrankungen bei Pferden stellten Barton und Collatos 1999 her als sie die Konzentration von Endotoxinen sowie Tumor-Nekrose-Faktor- α - und Interleukin-6- Aktivität im Blut und in der Bauchhöhlenflüssigkeit von Pferden mit Koliken ermittelten. Sie fanden heraus, dass Entzündungsmediatoren und Endotoxine eine Korrelation aufweisen, sich vor allem das Interleukin-6 als prognostischer Marker für den Schweregrad und z.T. sogar zur Differenzierung verschiedener Kolikursachen eignet, alle drei Faktoren die Diagnose und Prognose von „non survivors“ verbessern und vor allem, dass die Abwesenheit aller drei Parameter ein Überleben des Patienten sicher prognostizieren kann (Barton und Collatos 1999).

2.4 Matrix-Metalloproteinasen

Gross und Lapiere identifizierten 1962 bei ihrer Forschung an der Metamorphose von Amphibien ein Enzym (Kollagenase), dessen proteolytische Funktion die fibrillären Strukturen von Kollagen zerstörte. Das entdeckte Protein legte den Grundstein einer ganzen Familie von

Zink-abhängigen Endopeptidasen (Matrix-Metalloproteinasen), deren Rolle bei der Adaption von Geweben an physiologische und pathologische Vorgänge durch Ab- und Umbauvorgänge der Extrazellulärmatrix seitdem zum Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten wurde (Brinckerhoff und Matrisian 2002; Gross und Lapiere 1962).

Bei den MMPs handelt es sich um Zink-Metalloenzyme, die ein hoch konserviertes, für die Enzymaktivität entscheidendes Zinkbindungsmotiv im Zentrum aufweisen. Ihre Grundstruktur besteht aus einem autoinhibitorischen Pro-Peptid, einer katalytischen sowie einer Hämopexin ähnlichen C-terminalen Domäne. Das Pro-Peptid wird zur Aktivierung des Enzyms am Zielort bzw. bei entsprechenden Umständen durch andere Proteasen, wie beispielsweise Plasmin oder andere MMPs, abgespalten und gibt so das katalytische Zentrum frei (Page-McCaw et al. 2007; Lijnen 2001). An dieser Stelle befindet sich eine hoch konservierte Region mit einem Cystein- und einem Zink-Atom, welches über Histidin Moleküle in das Protein eingebunden ist. Zudem ist dies der Ort, an dem die Widersacher der MMPs, die TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinase), ihre Wirkung entfalten (Nagase et al. 2006; Butler et al. 2004).

Jedes der Matrix-Metalloproteinasen-Familie zugehörigen Enzyme zeigt eine Affinität zu bestimmten Proteinen der extrazellulären Matrix, wie zum Beispiel zu Kollagen, Glukosaminen, Proteoglykanen oder Glykoproteinen. Entsprechend ihrer Struktur-, bzw. Sequenzhomologie, sowie ihrer Substratspezifität sind die MMPs in Subklassen eingeteilt. Drei von ihnen bilden die Kollagenasen (MMP-1, MMP-8 und MMP-13), zwei die Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9), fünf die Stromelysine (MMP-3, MMP-10, MMP-11, MMP-7 sowie MMP-26) und sechs die membrangebundenen MMPs (MT1-MMP bis MT6-MMP). Die Restlichen bilden aufgrund struktureller Unterschiede eigene Subklassen (Schuhmacher 2011; Nagase et al. 2006).

Während ursprünglich davon ausgegangen wurde, dass die Funktion der MMPs vornehmlich in der strukturellen Degradierung der Extrazellulärmatrix besteht, weiß man heutzutage um die vielfältigen Auswirkungen ihrer enzymatischen Aktivität auf zelluläres Verhalten. Zum einen vermag die Proteolyse von Komponenten der extrazellulären Matrix Räumlichkeiten für Zellmigrationen zu schaffen, zum anderen entstehen durch sie spezifische Spaltprodukte, die autokrine oder parakrine Signalkaskaden einleiten können. Außerdem besitzen MMPs die Fähigkeit, Einfluss auf epitheliale Strukturen zu nehmen, indem sie interzelluläre Verbindungen oder Basalmembranen spalten. Des Weiteren können MMPs aktive Signalmoleküle modifizieren oder latente aktivieren beziehungsweise deaktivieren und so Veränderungen in der Zellproliferation, -differenzierung sowie im -tod bewirken (Lee et al. 2005; Hamano et al. 2003; McQuibban, et al. 2001).

2.4.1 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) im Kontext der Entzündung

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). Es ist sogar möglich, dass die gleiche Protease abhängig vom jeweiligen Krankheitsbild unterschiedliche Ziele unterstützt. MMP-9 zum Beispiel fördert in Modellversuchen an Mäusen bei Schlaganfällen, Herzinfarkten, Asthma, Aorten-Aneurysmen, autoimmunen Encephalomyelitiden und Alzheimer die Entstehung von Entzündungen, während sie bei Modellen von Nierenerkrankungen und Dermatitiden antientzündliche Wirkung hat (Lee et al. 2005; Lanone et al. 2002; Lelongt et al. 2001; Asahi et al. 2001; Pyo et al. 2000). Auch bei nahezu jeder Art von Tumorwachstum, -invasion sowie -metastasierung, oftmals von entzündlichen Geschehen begleitet, konnte eine vermehrte Expression von MMPs beobachtet werden, die zusätzlich in direkter Assoziation mit einer kürzeren Überlebensrate steht. Das Überleben und die Vermehrung der Tumorzellen scheinen dabei direkt abhängig von der Aktivität verschiedener Matrix-Metalloproteinasen zu sein (Piperigkou et al. 2021; Conlon und Murray 2019; Brown und Murray 2015; Halbersztadt et al. 2006; Egeblad und Werb 2002; Itoh und Nagase 2002). Vor allem MMP-14 (eine Transmembran-MMP) wird in Tumorzellen und Tumor-assoziierten Stromazellen häufig exprimiert und ist für Metastasierung und Invasion der entarteten Zellen (mit)verantwortlich (Conlon und Murray 2019; Okada et al. 1995; Sato et al. 1994).

In der Pferdemedizin weisen aktuelle Forschungsansätze auf die bedeutende Rolle der Matrix-Metalloproteinasen bei der Regulation von Entzündungskaskaden im Zusammenhang mit verschiedenen Pathologien 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 MMP-2, -9 und -8 begleitet werden (Loftus et al. 2009; Fietz et al. 2008; Martinen et al. 2006).

Auch der für dieses Promotionsvorhaben interessante Zusammenhang zwischen erhöhter Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen und den Entzündungskaskaden im Zuge einer Sepsis wurde sowohl im Allgemeinen als auch spezifisch bei Pferden mit akutem Abdomen bereits verifiziert. Barton et al. stellten fest, dass die durch gramnegative Bakterien verursachte Endotoxämie bei Pferden mit akutem Abdomen zur Aktivierung und Produktion von verschiedenen Matrixmetalloproteinasen führen kann. Vor allem MMP-9 konnte auf Grundlage

dessen als wertvoller diagnostische Marker für endotoxämische Kolik-Patienten eingeführt werden (Barton et al. 2021; Barton et al. 2019b). 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, Oxytetracyclin, Flunixin-Meglumin und Pentoxifyllin) wieder senken lässt (Fugler et al. 2013). Des Weiteren konnte eine vermehrte gelatinolytische Aktivität von MMP-2 im Serum von Pferden mit einer akuten Kolik zur Abschätzung eines Nierenversagens nachgewiesen werden (Arosalo et al. 2007). Diese Zusammenhänge gelten nicht nur für die Spezies Pferd. Bei Menschen, die an einer Sepsis litten, konnte ebenfalls festgestellt werden, dass MMP-2 und -9 eine verstärkte gelatinolytische Aktivität aufweisen (Tayebjee und Lip 2007). Entzündungsmediatoren, freigesetzt durch Strangulationen des Gastrointestinaltraktes von Ratten, führen außerdem zu einer Liberation von MMPs aus peritonealen Makrophagen (Xie et al. 1994).

2.5 Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs)

TIMPs sind eine Familie von Glykoproteinen, die durch selektive Inhibierung die Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen regulieren, indem sie nichtkovalent an deren aktive Form binden. Im Durchschnitt weisen sie eine molekulare Größe von 28,5 kDa auf, mit geringen Variationen zwischen verschiedenen Spezies (Stetler-Stevenson et al. 1989). Die ersten TIMPs wurde 1975 aus kultivierten menschlichen Fibroblasten sowie Serum isoliert und als Proteine mit der Fähigkeit, Kollagenase-Aktivitäten zu unterbinden, beschrieben (Bauer et al. 1975; Woolley et al. 1975).

Die Familie der „tissue inhibitors of metalloproteinases“ besteht derzeit aus vier Mitgliedern (TIMP 1–4) (Gomez et al. 1997). Diese weisen zwar teilweise strukturelle und funktionelle Übereinstimmungen auf, unterscheiden sich aber im Muster ihrer Expression und in ihren Verhaltensweisen in Zellen, Geweben und Flüssigkeiten. TIMP-1 und TIMP-2 liegen in flüssiger Form vor, wobei TIMP-1 auf eine Vielzahl externer Stimuli reagiert, während die Expression von TIMP-2 konstitutiv zu sein scheint (Holdenrieder und Stieber 2019). Mit ihrer elastolytischen und kollagenolytischen Aktivität spielen TIMP-1 und -2 eine wichtige Rolle in der Wundheilung, Zellmorphologie, Inhibition von Tumormetastasierung, -wachstum, -invasion, Angiogenese und im Entzündungsgeschehen (Gardner und Ghorpade 2003; Mohanam und Rao 1999; Clegg et al. 1998). TIMP-3 ist unlöslich und eine Komponente der extrazellulären Matrix selbst sowie Bestandteil der Supprimierung von Tumorzellwachstum (Nagase et al. 2006; Mohammed et al. 2004; Mohanam und Rao 1999). TIMP-4 stellt die

gewebsspezifischste Protease der Familie dar und wird vor allem im Herzen exprimiert (Sun et al. 2015; Mohanam und Rao 1999).

Die Integrität gesunden Gewebes ist maßgeblich von der Balance aus Degradierung der extrazellulären Matrix mittels MMPs sowie deren Inhibition durch TIMPs abhängig, wobei sich bei pathologischen Geschehen die Relation zugunsten der MMPs und ihrer elastolytischen und kollagenolytischen Aktivität zu verschieben scheint (Verstappen und von den Hoff 2007; Gardner und Ghorpade 2003; Bode et al. 1999). Dementsprechend stand das Zusammenspiel von Matrix-Metalloproteinasen und ihren Inhibitoren bei entzündlich/pathologischen Vorgängen auch in der Pferdemedizin bereits häufiger im Fokus der Forschung. Bei einer Studie an Pferden mit mildem bis schwerem equinen Asthma konnte eine Erhöhung der Konzentration an MMP-2, -8 und -9 sowie TIMP-1 und -2 in der bronchoalveolären Lavage festgestellt werden, die mit dem Schweregrad der klinischen Symptome korreliert und sich nach erfolgter Therapie mit immunstimulierenden CpGs nicht mehr nachvollziehen lässt. Besonders das Verhältnis von MMP-8/TIMP erscheint durch das Anzeigen einer kollagenolytischen Dysbalance von hohem diagnostischem Wert (Barton et al. 2019a; Barton et al. 2016; Barton et al. 2015). Bei Stuten mit einer akuten Endometriose scheint es zu einer durch TGF- β 1 regulierten Expression verschiedener MMPs und TIMPs aus Fibroblasten und Epithelzellen zu kommen (Szóstek-Mioduchowska et al. 2020) und auch aus der orthopädischen Fachrichtung gibt es Veröffentlichungen, die eine veränderte Expression von TIMPs (und MMPs) aus Synoviozyten und Epithelzellen bei septischen/entzündlich degenerativen Gelenken beschreiben (Mora et al. 2015; Clegg et al. 1998).

2.6 Zusammenwirken von Zytokinen, MMPs und TIMPs im Kontext der Entzündung

Die Rollen, die Zytokine, Matrix-Metalloproteinasen sowie deren Inhibitoren für das Immunsystem spielen, sind vielfältig miteinander verknüpft. Neben den eigenen Substraten können Wachstumsfaktoren und Zytokine wie Interleukin, Interferon, TNF- α , TGF- β sowie der MMP-inducer EMMPRIN die Expression von MMPs regulieren (Yan und Boyd 2007; Strazielle et al. 2003; Sternlicht und Werb 2001). So konnte beispielsweise festgestellt werden, dass proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β die Freisetzung von MMP-2 aus Gewebezellen der Rattenaorta zu stimulieren vermögen (Lalu et al. 2006). Demnach ist die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen abhängig von der Anzahl an Zytokinen und den zellulären Veränderungen, welche diese induzieren. Zwischen den Proteasen, Chemokinen und Zytokinen bestehen diverse Formen der Interaktion, gegenseitigen Kontrolle und Ergänzung (Nagase und Woessner 1999; Opdenakker et al. 1998; Opdenakker und Van Damme 1994).

MMP-9 zum Beispiel katalysiert die Aktivierung der Zytokine IL-1 β und TNF- α sowie die des Chemokins IL-8. Letztgenanntes stimuliert nun seinerseits die Degranulierung von PMNs (polymorphkernige Leukozyten) und führt so zu einer erneuten MMP-Freisetzung (Opdenakker et al. 2001). Zwischen den Zytokinen und Matrix-Metalloproteinasen besteht demnach ein positiver Feedback-Mechanismus.

Bei verschiedenen Zytokinen, MMPs sowie TIMPs weiß man aus bisherigen Forschungsarbeiten um zahlreiche konkrete Verknüpfungen in den Kaskaden der Entzündungsmediatoren des Immunsystems (Wang und He 2018; Naruishi und Nagata 2018; Newby 2016; Osman et al. 2011). MMP-2 (und MMP-9) sowie deren spezifische endogene Inhibitoren (TIMPs) stellen beispielsweise wichtige Faktoren in der Pathophysiologie von neuroinflammatorischen Erkrankungen dar (Pagenstecher et al. 1998). Beide Matrixmetalloproteinasen sind außerdem an der regulatorischen Kaskade von Überempfindlichkeitsreaktionen wie Asthma beteiligt (Greenlee et al. 2006; Corry et al. 2004). Endotoxämien und die mit ihnen im Zusammenhang stehenden Entzündungsmediatoren sind überdies Bestandteil der regulatorischen Kreisläufe bei (akuten) vaskulären Entzündungsgeschehen (Chen et al. 2013; Lalu et al. 2004; McQuibban et al. 2000). Sowohl LPS als auch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β verändern das Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs und bewirken so eine vaskuläre Dysfunktion, welche sich unter dem Einfluss von MMP-Inhibitoren zum Teil reversibel zeigt (Lalu et al. 2006). Die im Zuge eines Kolikgeschehens bei Pferden drohende Entzündungskaskade beginnt mit der durch gramnegative Bakterien ausgelösten Sepsis (King und Gerring 1988; Meyers et al. 1982), welche sowohl zur Aktivierung und Produktion von MMPs als auch zur Freisetzung von Zytokinen aus Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen führt (Barton et al. 2019b; Barton und Collatos 1999). Die anschließend im Kreislauf zirkulierenden Entzündungsmediatoren wie beispielsweise IL-1, TNF- α , IL-6 vermögen die Produktion von akute-Phase-Proteinen in der Leber zu stimulieren, die nun ihrerseits das Immunsystem bei der Sanierung des Entzündungsherdens unterstützen (Pugin et al. 1999).

2.7 Labordiagnostik bei Pferden mit Koliksymptomen

Neben der gründlichen Anamnese, einer klinischen, rektalen und häufig auch ultrasonografischen Untersuchung sowie dem Schieben einer Nasenschlundsonde gehören labordiagnostische Analysen des Blutes und zum Teil auch der Peritonealflüssigkeit zum medizinischen Standard bei der Diagnostik, Prognose und Therapieentscheidung bezüglich eines Pferdes mit akuten abdominalen Schmerzen (Burke und Blikslager 2018; Cook und

Hassel 2014, Cavalleri et al. 2013; Issaoui 2012; Dukti und White 2009; Fischer 1997; Fischer 1989).

2.7.1 Laboranalysen von Blut/Serum/Plasma

Die Viskosität des Blutes ist bei Pferden mit letalem Ausgang eines „Kolikgeschehens“ erhöht (Andrews et al. 1990). Eine Messung des Hämatokrits (Hkt) und Gesamtproteins (TP) ist daher empfehlenswert und kann mittels Zuhilfenahme einer Zentrifuge und eines Refraktometers durchgeführt werden (Liappis und Jäkel 1978; Norberg und Warvenius 1952). Beide Werte geben unter anderem Rückschluss auf den Hydratationsstatus eines Patienten und verfügen so direkt oder indirekt über diagnostischen und prognostischen Wert (Stephens 1985). So geht zum Beispiel bei Pferden, die einer Dünndarmresektion unterzogen wurden, eine niedrige Gesamteiweißkonzentration im Plasma mit einer schlechten Überlebensprognose einher, wohingegen der präoperative Hämatokrit bei einer Erhöhung zu einer schlechteren postoperativen Prognose beiträgt (Gitari et al. 2016; Müller et al. 2009; Proudman et al. 2005; Morton und Blikslager 2002).

Veränderungen im weißen Blutbild eines „Kolikers“ sowohl in Form einer Leukozytose als auch Leukopenie können die Diagnose von Entzündung, Endotoxämie oder Sepsis stützen (Sheats 2019; Salciccia et al. 2013; Krista et al. 2013; Carrick und Begg 2008; Weiss und Evanson 2003; Seahorn et al. 1994; Perry et al. 1983). Die initiale Leukopenie von endotoxämischen Patienten begründet sich aus verschiedenen Verhaltensweisen der Leukozyten in der Gegenwart eines entzündlichen Stimulus. Endotoxine, Entzündungsmediatoren wie Zytokine und Komplementfaktoren induzieren die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen, das Aufrollen von Leukozyten entlang innerer Gefäßwände (Margination) sowie deren transzelluläre und extravaskuläre Migration (Planck et al. 2008; Ley et al. 2007; Herion et al. 1960). Der anfänglichen Leukopenie folgt häufig eine „Rebound-Leukozytose“, die auf eine vermehrte Anzahl von neutrophilen Granulozyten im Körperkreislauf zurückzuführen ist. Ursächlich für diese Neutrophilie ist eine durch Zytokine ausgelöste, erhöhte Kortikosteroid-Produktion, welche eine Demargination der Leukozyten sowie ein verlängertes Leben der Neutrophilen bewirkt (Peñailillo et al. 2016).

Pferde, die bei Aufnahme in die Klinik aufgrund einer akuten gastrointestinalen Erkrankung nicht an einer Leukozytose leiden, genesen laut Roy et al. 2017 sehr viel wahrscheinlicher von ihrer Erkrankung (Roy et al. 2017). Bei drastischen Leukopenien von <1500 Zellen/ μL sollte

die Möglichkeit einer intestinalen Perforation in Betracht gezogen werden (Southwood und Walton 2012).

Vor allem bei Patienten, die an Diarrhö, Enteritis oder starkem Reflux leiden, kommt es zu Anomalien im Säure-Basen- und Elektrolythaushalt, welche mittels einer venösen Blutgasanalyse festgestellt und gegebenenfalls per entsprechender Dauertropfinfusion behandelt werden sollten (Rose 1981). Abweichungen im Säure- Basen-Haushalt können entweder direkt durch das Messen von Bikarbonat- Konzentrationen, dem Blut-PH, dem Basenüberschuss und dem Kohlenstoffdioxidpartialdruck ermittelt werden oder lassen sich durch das Errechnen der sogenannten "strong ion difference" eruieren (Navarro et al. 2005). Bei diesem quantitativen Ansatz werden Anionen wie Chloride oder Proteine als Säuren verstanden, wohingegen Kationen wie Natrium, Magnesium oder ionisiertes Kalzium als Basen definiert werden. Metabolische Störungen, die zu Verschiebungen dieser Elektrolyte aus ihren Normbereichen führen, beeinflussen demnach direkt den Säure-Basen-Haushalt des Patienten (Southwood und Walton 2012; Slawuta et al. 2010). Die Blutanalysen von Pferden mit akuten abdominalen Schmerzen zeigen dabei vor allem verminderte Werte an Bikarbonat und Basenüberschuss bei normalem oder verringertem PH-Wert im Vergleich zu gesunden Tieren (Van Hoogmoed et al. 1999; Ayaz et al. 1999; Ayaz et al. 1997; Staempfli et al. 1991; Reeves et al. 1989; Kalsbeek 1975). Sollte die Kolik auf eine ischämische gastrointestinale Erkrankung zurückzuführen sein, ist hingegen das Auftreten einer Alkalose wahrscheinlicher als das einer Azidose. Je nach Kolikursache kommen außerdem verringerte Kalzium- Kalium-, Natrium- und Magnesium- Konzentrationen vor (Navarro et al. 2005; Nappert und Johnson 2001).

Das Laktat als Produkt der anaeroben Glykolyse - meistens in Folge einer Hypoxie aufgrund einer Hypoperfusion - kann ischämische Schädigungen von Geweben, beispielsweise der Darmwände, widerspiegeln und so dem Diagnostiker bei der Einschätzung des Schweregrades der abdominalen Erkrankung sowie deren Prognose helfen (Tennent-Brown 2011). Weitere Gründe für einen erhöhten Laktatwert bei Pferden mit akuten Abdominalschmerzen können Sepsis, Endotoxämie, Lebererkrankungen oder eine deutliche Alkalose sein (Tennent-Brown 2012; Genn und Hertsch 1982; Moore et al. 1976; Donawick et al. 1975). Die physiologische Plasmalaktatkonzentration liegt bei $<2\text{mmol/L}$ (die in der Bauchhöhlenflüssigkeit bei $<1\text{mmol/L}$) mit einer maximalen Relation des Laktats in der Peritonealflüssigkeit im Verhältnis zur Plasmalaktatkonzentration von <1 (Southwood und Walton 2012). Sowohl die Laktatkonzentrationen in der Peritonealflüssigkeit als auch im Plasma sind bei Pferden mit intestinaler Ischämie (in der Regel sekundär zu Strangulationen von Darmabschnitten) erhöht (Delesalle et al. 2007). Der Laktatwert aus dem Bauchhöhlenpunktat entzieht sich dem Einfluss der systemischen Hypoperfusion und steigt in

der Regel bei Ischämien des Gastrointestinaltrakts deutlich schneller und stärker an als der im Plasma, wodurch ihm eine noch größere prognostische Wertigkeit zukommt (Delesalle et al. 2007; Latson et al. 2005). Doch auch aus dem Messen der Laktatkonzentration im Plasma lassen sich eindeutig Rückschlüsse auf die Prognose des Patienten mit akutem Abdominalschmerz ziehen (Johnston et al. 2007; Feary und Hassel 2006; Latson et al. 2005).

Selbst organspezifische Enzyme wie die Serum- γ -Glutamyltransferase (GGT) können bei der Erforschung der Ätiologie des Abdominalschmerzes von Nutzen sein: In einer Studie von Gardner et al. aus dem Jahr 2005 wiesen Pferde mit einer Rechtsdorsalverlagerung des Kolons in knapp 49% der Fälle eine erhöhte Serum- γ -Glutamyltransferase (GGT) im Serum auf, aber nur 2% der Pferde mit linker dorsaler Dislokation. Dieser Anstieg der GGT bei Pferden mit einer dorsalen Verlagerung nach rechts wird auf eine Obstruktion des Gallengangs zurückgeführt (Gardner et al. 2005).

Bei den metabolischen Parametern aus der Labordiagnostik ist vor allem der Blutglukosespiegel für den Diagnostiker interessant. Pferde mit akuten abdominalen Schmerzen weisen häufig eine erhöhte Konzentration an Glukose im Blut auf (da Costa et al. 2020; Paim et al. 2019). Eine solche Hyperglykämie steht zum einen in Relation zur Ursache des Abdominalschmerzes und ist zum anderen vor allem in den ersten 48 Stunden nach Klinikeinlieferung negativ mit der Überlebensprognose assoziiert (Gitari et al 2016; Hassel et al. 2009; Hollis et al. 2007).

2.7.2 Abdominozentese

Die Peritonealflüssigkeit ist ein Ultrafiltrat des Blutplasmas. Abgegeben wird sie durch das Peritoneum, welches als semipermeable Membran den Austausch kleiner Moleküle zwischen der Bauchhöhle und dem Blutplasma ermöglicht (Shear et al. 1965). Sie verbindet antiadhäsive Eigenschaften mit antibakteriellen und dient so dem Schutz der intraabdominalen Organe und serösen Gewebe (Ağca et al. 2018; Michel et al. 1980; Richardson und Borchardt 1972). Der Abtransport der Peritonealflüssigkeit erfolgt über das lymphatische System zurück in den Körperkreislauf (Milne 2004). Die Gewinnung eines Bauchhöhlenpunktates zu diagnostischen sowie prognostischen Zwecken bei Pferden mit entzündlichen Prozessen, Kolik und Dystokie wurde 1964 von Maksic zum ersten Mal eingeführt (Swanwick und Wilkinson 1976). Bei der Abdominozentese wird die Bauchhöhle steril punktiert, um Peritonealflüssigkeit für laboranalytische Untersuchungen zu gewinnen. Durchgeführt wird die Bauchhöhlenpunktion vor allem bei Pferden mit akuten abdominalen Schmerzen, Enterokolitis

sowie dem Verdacht auf eine Peritonitis oder ein tumoröses Geschehen im Abdomen (Blikslager 2006; Matthews et al. 2002; Fulton et al. 1990; Cowell et al. 1987). Während bei letzterem die zytologische Interpretation der Probe von Nöten ist, sieht der bisherige medizinische Standard in den Kliniken für die weiterführende Diagnostik bei Patienten mit akutem Abdomen in der Regel die biochemischen/hämatologische Bestimmungen des Laktates, des Gesamtproteins, der Zellzahl sowie die makroskopische Bewertung der gewonnenen Flüssigkeit auf Menge, Farbe und Klarheit vor (Milne 2004). Auch ein mehrfaches Durchführen der Abdominozentese hat keinen negativen Einfluss auf die Auswertbarkeit der Laborparameter (Duesterdieck-Zellmer et al. 2014; Juzwiak et al. 1991).

2.7.3 Laboranalysen von Peritonealflüssigkeit

Die Konzentration an Totalprotein und der Zellgehalt im Bauchhöhlenpunktat sorgen mit steigendem Wert für die Unterscheidung in Transsudat, modifiziertes Transsudat und Exsudat. Sie geben Auskunft über den Kreislaufzustand sowie entzündliche und ischämische Vorgänge im betroffenen Gebiet (Milne 2004). Vor allem ein Anstieg des Totalproteins hat sich - zusammen mit der Feststellung der (physiologischen) Farbe der Bauchhöhlenflüssigkeit - als prognostischer Hinweis zur Entscheidung für eine medikamentöse oder chirurgische Therapie bewährt (Matthews et al. 2002). Abweichungen in der Farbe des gewonnenen Bauchhöhlenpunktats gehören neben dem Volumen und der Klarheit zu den wichtigen makroskopischen Indikatoren für eine akute abdominale Pathologie (Matthews et al. 2002; Nelson 1979). Eine physiologische Bauchhöhlenflüssigkeit stellt sich klar und leicht gelblich dar. Rötliche Verfärbungen sind – wenn nicht durch versehentliche Punktion peripherer Venen oder der Milz erfolgt – ein Anzeichen von Hämolyse/Hämorrhagie, dunkelgelbe von Dehydratation/Hyperbilirubinämie und bräunliche für eine Ruptur des Magen-Darm-Traktes (Milne 2004; Matthews et al. 2002).

Neben den “Klassikern der Diagnostik”, nämlich der Zellzahl und dem Gehalt an Totalprotein, gibt es zahlreiche weitere Parameter, deren Bestimmung aus der Bauchhöhlenflüssigkeit zu einer genaueren Diagnose und Prognose für den equinen Kolik- Patienten herangezogen werden können: Mehrere Enzyme wurden in diesem Kontext bereits Gegenstand veterinärmedizinischer Forschung (Kilcoyne et al. 2019; Smuts et al. 2016; Saulez et al. 2004). Saulez et al. veröffentlichten zu diesem Thema eine Studie, mit der sie darstellen konnten, dass die Aktivität der alkalischen Phosphatase - ein Enzym, das unter anderem in der intestinalen Mukosa vorkommt - in der Peritonealflüssigkeit von Pferden mit einer akuten Kolik hilfreich bei der Identifizierung von ischämischen oder entzündlichen Darmläsionen sein kann

(Saulez et al. 2004). Ein weiterer geeigneter Parameter für die Diagnostik bei Patienten mit akuten gastrointestinalen Erkrankungen ist die Kreatinkinase (CK) (Kilcoyne et al. 2019; Krueger et al. 2014). Dieses Enzym kommt neben seinen typischen Lokalisationen im Gehirn, dem Myokard oder der Skelettmuskulatur auch in der Submukosa der Darmschleimhaut vor. Kilcoyne et al. maßen die Plasma- und Peritonealflüssigkeitskonzentration von gesunden und an Abdominalschmerz leidenden Pferden. Auf diese Weise konnten sie 2017 beweisen, dass die Kreatinkinasenkonzentration in der Peritonealflüssigkeit ein sensitiver Indikator für die Diagnose einer Strangulation eines Darmabschnittes darstellen kann (Kilcoyne et al. 2019). Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein Enzym, das im Zytoplasma von fast allen Zelltypen vorkommt und dessen Konzentration in der Bauchhöhlenflüssigkeit von Pferden mit akuten Abdominalschmerzen ebenfalls zu einer genaueren Prognosestellung herangezogen werden kann (Rani et al. 2018; Smuts et al. 2016). Ihre höhere Aktivität im Bauchhöhlenpunktat korrelierte 2015 in einer Studie von Smuts et al. sowohl mit dem Schweregrad der Kolik als auch mit der Laktatkonzentration in der Peritonealflüssigkeit (Smuts et al. 2016).

Auch bei anorganischem Phosphor, sprich Phosphat, im Bauchhöhlenpunktat weiß man seit geraumer Zeit (seit 1988) um seine Sensitivität und Spezifität, wenn es um die Vorhersage von intestinalen Läsionen bei kolikenden Pferden geht: Die Konzentration an Phosphat sowohl im Serum als auch in der Peritonealflüssigkeit von Pferden mit akuten abdominalen Schmerzen steigt bei Patienten, die einer chirurgischen Intervention bedürfen oder deren Krankheitsverlauf letal ist, deutlich an (Arden und Stick 1988).

Ein weiterer diagnostischer Marker für den Schweregrad von intestinalen Läsionen ist die Vorstufe des Hormons Calcitonin: das sogenannte "Procalcitonin" (PCT) (Kilcoyne et al. 2020; Teschner et al. 2015; Rieger et al. 2014). Rieger et al. stellten 2014 einen neuen Sandwich-ELISA für die Bestimmung von equinem Procalcitonin aus dem Plasma von septischen (und gesunden) Pferden vor. Bereits in ihrer relativ kleinen Probandengruppe von fünf endotoxämischen Kolikern konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Plasma-Konzentrationen an PCT bei gesunden oder septischen Tieren festgestellt werden (Rieger et al. 2014). Darauf aufbauend wiesen Teschner et al. 2015 nach, dass endotoxämische Pferde mit einem Strangulationsileus signifikant höhere Konzentrationen an Procalcitonin und (IL-1 β) im Plasma haben als gesunde Kontrollpferde. Als prognostischer Marker für den weiteren Krankheitsverlauf beziehungsweise die Überlebensrate der Patienten eignet sich das von ihnen quantifizierte Polypeptid allerdings nicht (Teschner et al. 2015). Kilcoyne et al. veröffentlichten 2020 ebenfalls eine Studie, mit derer sie den diagnostischen Wert der Konzentration an Procalcitonin im Plasma und der Peritonealflüssigkeit von Pferden mit strangulierenden Darmläsionen verdeutlichten. Sie fanden heraus, dass der durchschnittliche Gehalt an Procalcitonin sowohl im Plasma als auch in der Bauchhöhlenflüssigkeit bei

kolikenden Pferden signifikant höher als bei der gesunden Kontrollgruppe ist. Des Weiteren stellt sich die Konzentration dieses Prohormons in der Peritonealflüssigkeit von Tieren mit einer Strangulation eines Darmabschnittes signifikant größer dar als bei Pferden ohne derartige Komplikationen. Eine Konzentration von ≥ 281.7 pg/mL Procalcitonin im Bauchhöhlenpunktat weist eine Sensitivität von 81%, eine Spezifität von 69%, einen positiven Vorhersagewert von 56.7% sowie einen negativen Vorhersagewert von 87.9% für die korrekte Diagnose von strangulierenden Darmläsionen auf (Kilcoyne et al. 2020).

Trotz dieser vielen verschiedenen Forschungsansätze ist die Laktatkonzentration in der Bauchhöhlenflüssigkeit bisher derjenige biochemische Marker, auf den in der Diagnostik und Prognostik des Schweregrads eines „Kolikers“ neben den klinisch-relevanten kardiovaskulären Parametern wie beispielsweise Blutdruck, Herzfrequenz oder kapilläre Rückfüllungszeit am meisten Wert gelegt wird (Henderson 2013; Peloso und Cohen 2012; Parry et al. 1983). Das akute Versagen des systemischen Kreislaufs aufgrund einer intestinalen Ischämie, hervorgerufen durch die Strangulation eines Darmabschnittes, gilt als die häufigste Todesursache von Pferden mit abdominalen Schmerzen (Latson et al. 2005; Tendler 2003; Tinker et al. 1997). Die Laktatkonzentration in der Peritonealflüssigkeit ist laut zahlreicher Studien ein sehr sensibler Marker für eine derartige lokale Hypoperfusion und in ihrer diagnostischen Aussagekraft der Laktatkonzentration im Blutplasma weit überlegen (van den Boom et al. 2012; Peloso und Cohen 2012; Yamout et al. 2011; Delesalle et al. 2007; Latson et al. 2005; Parry et al. 1983).

Die diagnostische und prognostische Aussagekraft von Zytokinen (TNF- α , IL-6) sowie Endotoxinen im Blut und vor allem in der Peritonealflüssigkeit bei Pferden mit akutem Abdominalschmerz wurde bereits 1999 von Barton und Collatos untersucht. Sie kamen zu dem Schluss, dass die Konzentrationen dieser Entzündungsmediatoren bei kolikenden Pferden sowohl im Blut, besonders aber in der Bauchhöhlenflüssigkeit stark erhöht sind. Als aussagekräftigster Marker für entzündliche oder strangulierende Darmläsionen stellte sich dabei das Interleukin-6 heraus. Generell war die Aktivität der Zytokine deutlich erhöht, wenn in derselben Probe auch Endotoxine detektiert werden konnten. Vor allem die Abwesenheit aller drei Entzündungsparameter präsentierte sich als signifikanter Indikator für die Vorhersage eines günstigen Krankheitsverlaufs (Barton und Collatos 1999).

3 Material und Methode

3.1 Patientengut

Zwischen März 2017 und Januar 2018 wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit 47 Pferde mit Koliksymptomen divergierenden Schweregrads und unterschiedlicher Genese, welche in die Pferdeklinik der Freien Universität Berlin eingewiesen wurden, untersucht. Grundsätzliche Daten wie Rasse, Alter, Geschlecht und Gewicht wurden routinemäßig festgehalten (siehe Tab. 8 im Anhang). Nach Ankunft erfolgte eine gründliche Anamnese bezüglich der Charakteristik der bisherigen Koliksymptome.

3.2 Allgemeine und spezielle Untersuchungen

Anschließend fand eine allgemeine klinische Untersuchung der Patienten, eine Laboranalyse des Blutes und eine spezifische Untersuchung des Verdauungssystems inklusive rektaler sowie ultrasonografischer Evaluation des Abdomens, Schieben einer Nasenschlundsonde (siehe Bild 1) und Abdomintozentese (siehe Bild 2 und 3), welche immer zu Befundzwecken indiziert war, statt. Aufgrund der Tatsache, dass alle erfolgten Untersuchungen und Probenahmen Teil der routinemäßigen Behandlung von Kolikern waren, wurde das Promotionsvorhaben vom Landesamt für Gesundheit und Soziales nicht als genehmigungspflichtiger Tierversuch eingestuft und bedurfte lediglich einer entsprechenden Meldung. Die Patientenbesitzer willigten außerdem bei Vorstellung ihres Pferdes in der Klinik schriftlich in die Teilnahme an der Studie ein. Erschien aufgrund des klinischen Bildes und der spezifischen Untersuchungsergebnisse eine chirurgische Versorgung nötig, erfolgte diese schnellstmöglich. Die übrigen Patienten erhielten je Diagnose eine konservative Therapie bestehend aus einer Variation an Infusionsmanagement, Medikation, Bewegung, Nahrungskarenz sowie dem Verabreichen von Wasser, Paraffinöl oder Glaubersalz per Nasenschlundsonde (siehe Tab. 8 im Anhang).

Bild 1 Schieben einer Nasenschlundsonde und Ablassen von Reflux bei einem Koliker



3.3 Anwendung des Sepsis Score

Zur Einschätzung des Schweregrads der Endotoxämie der Patienten wurden sie mittels eines modifizierten Sepsis-Scores nach Breuer und Schusser anhand ihres klinischen Bildes und zweier Laborparameter (Leukozytenzahl in G/l und ionisiertes Kalzium in mmol/l) beurteilt (Breuer und Schusser 2012). Der ursprüngliche Score wurde zum Zweck der besseren Umsetzbarkeit im Notdienst etwas vereinfacht (siehe Tab. 2). Das Allgemeinbefinden, die Herzfrequenz, die Atemfrequenz, die innere Körpertemperatur, die Maulschleimhäute 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 ($\leq 6/19$), jene mit sieben bis neun Punkten als „fraglich“ (7-9/19) und Pferde mit zehn oder mehr Punkten als „positiv“ ($\geq 10/19$).

Tab. 2 „Sepsis Score“ modifiziert nach Breuer und Schusser (2012):

Klassifikation in negativ ($\leq 6/19$ Punkte), fraglich (7-9/19 Punkte) oder positiv ($\geq 10/19$ Punkte) für Sepsis

| Parameter | 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 Gewinnung des Probenmaterials

Die Peritonealflüssigkeit wurde am stehenden Pferd, gegebenenfalls unter Sedierung, Lokalanästhesie oder Zuhilfenahme einer Nasenbremse, gewonnen. Zu diesem Zweck wurde die tiefste Stelle des Abdomens zwischen dem Processus xiphoideus und dem Bauchnabel, leicht rechts der Linea Alba zur Vermeidung einer Milzpunktion, geschoren und mit Jodseife gewaschen sowie Alkohol desinfiziert. Die Punktion erfolgte zum Teil unter Ultraschallkontrolle und mittels einer Injektionsnadel von 19 Gauge ungefähr vier bis sechs Zentimeter tief (siehe Bild 2 und 3). Das gewonnene Bauchhöhlenpunktat wurde makroskopisch analysiert, sein Gesamtprotein per Refraktometer bestimmt, das Laktat sowie die Gesamtzellzahl maschinell ermittelt (siehe Tab. 10 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 weitere Analysen bei -80 °C eingefroren.

Bild 2 sterile Punktion der Bauchhöhle eines der beprobten Pferde



Bild 3 Auffangen des Probenmaterials in einem sterilen Röhrchen



Die Blutproben wurden aus der Jugularvene der Patienten direkt nach Ankunft und vor Beginn einer Infusionstherapie gewonnen. Ein Teil des Blutes gelangte zur routinemäßigen Diagnostik in ein EDTA-Röhrchen. Das für unsere Forschungsabsichten analysierte Blut wurde sowohl in ein Natrium-Zitrat- als auch in ein Heparin- Röhrchen gefüllt. Zu diagnostischen Zwecken erfolgte die Bestimmung von Hämatokrit, Gesamteiweiß, Differentialblutbild und der venösen Blutgasanalyse (siehe Tab. 11 im Anhang). Zur Gewinnung von Plasma und Serum wurden die Blutproben bei 3500 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert und das erlangte Material bis zur endgültigen Analyse bei -80°C eingefroren, um Kontamination und die Abnahme von Bioaktivität zu verhindern. Während des Klinikaufenthaltes fanden bei entsprechender medizinischer Indikation Verlaufsuntersuchungen der Blutparameter statt.

3.5 Labordiagnostik

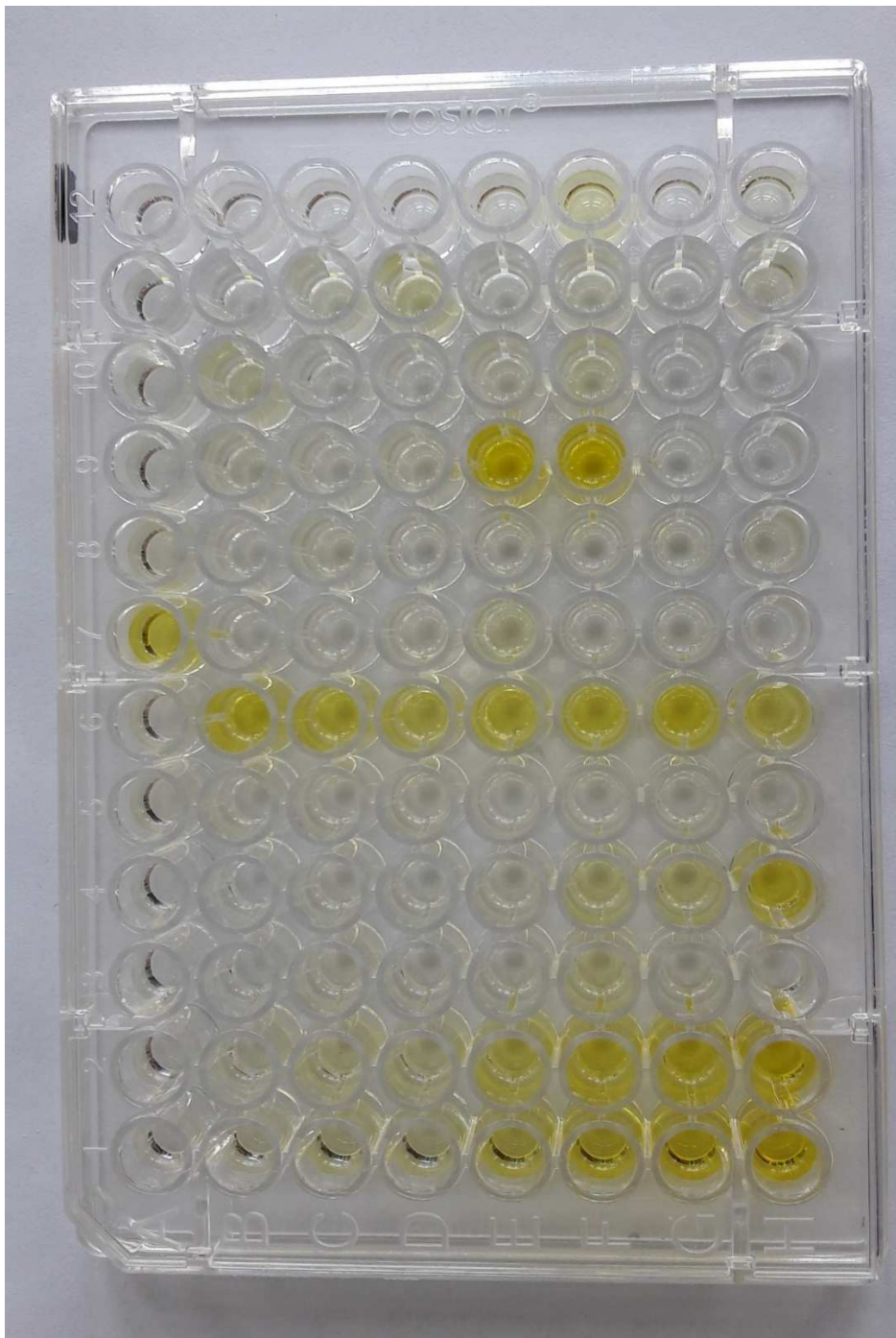
Der Nachweis der Entzündungsmarker aus dem Blut und der Bauchhöhlenflüssigkeit wurde im klinischen Forschungslabor der Freien Universität unter der Supervision von Fachärzten (Dipl. ECEIM) und labortechnischen Assistenten durchgeführt. Zur Quantifizierung der Zytokine IL-1 β und TNF α , der Matrix-Metalloproteinasen 2 und 8 sowie der TIMP-1 und -2 im Bauchhöhlenpunktat, Plasma oder ähnlichen Körperflüssigkeiten sind spezielle Pferde - Assays als ELISA Kits erhältlich: ELISA Kit für „Equine Matrix Metalloproteinase 2“ (MMP-2)^a, Cloud Clone Corp., USA, ELISA Kit für „Equine Matrix Metalloproteinase 8“ (MMP-8)^b, Genorise Scientific Inc., USA, ELISA Kit für „Equine Tissue Inhibitors of Metalloproteinase 1“ (TIMP-1)^c, Cloud Clone Corp., USA, ELISA Kit für „Equine Tissue Inhibitors of Metalloproteinase 2“ (TIMP-2)^d, Cloud Clone Corp., USA, ELISA Kit für „Equine Interleukin 1 beta“ (IL-1 β)^e, Cloud Clone Corp., USA und ELISA Kit für „Equine Tumor Necrosis Factor Alpha“ (TNF- α)^f, Cloud Clone Corp., USA (siehe Anhang: Fußnoten).

3.5.1 Prinzip der ELISA Kits

Die in vitro „enzyme-linked immunosorbent-Assays“ bestehen aus Mikroplatten, welche mit spezifischen Biotin-konjugierten Antikörpern für die Interleukine IL-1 β und TNF α , die Matrix-Metalloproteinasen 2 und 8 sowie die TIMP-1 und -2 vorbeschichtet wurden (siehe Bild 4). Die Patientenproben werden in die einzelnen Wells der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach der Beifügung von mit Meerrettichperoxidase markiertem Avidin, anschließender Inkubation und Zugabe von Substratlösung mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) färben sich nur diejenigen

Wells ein, die sowohl Biotin-konjugierte Antikörper, Enzym-konjugiertes Avidin als auch die zu quantifizierenden Zytokine, MMPs oder TIMPs enthalten. Die Farbintensität wird anschließend spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm +/- 10nm gemessen (ELISA microplate reader, Tecan, Switzerland)⁹ (siehe Anhang: Fußnoten). Durch das Abgleichen der Ergebnisse mit einer Standardkurve wird die genaue Konzentration der gesuchten Entzündungsmarker bestimmt (siehe Abb. 4).

Bild 4 ELISA – Mikroplatte für MMP-8



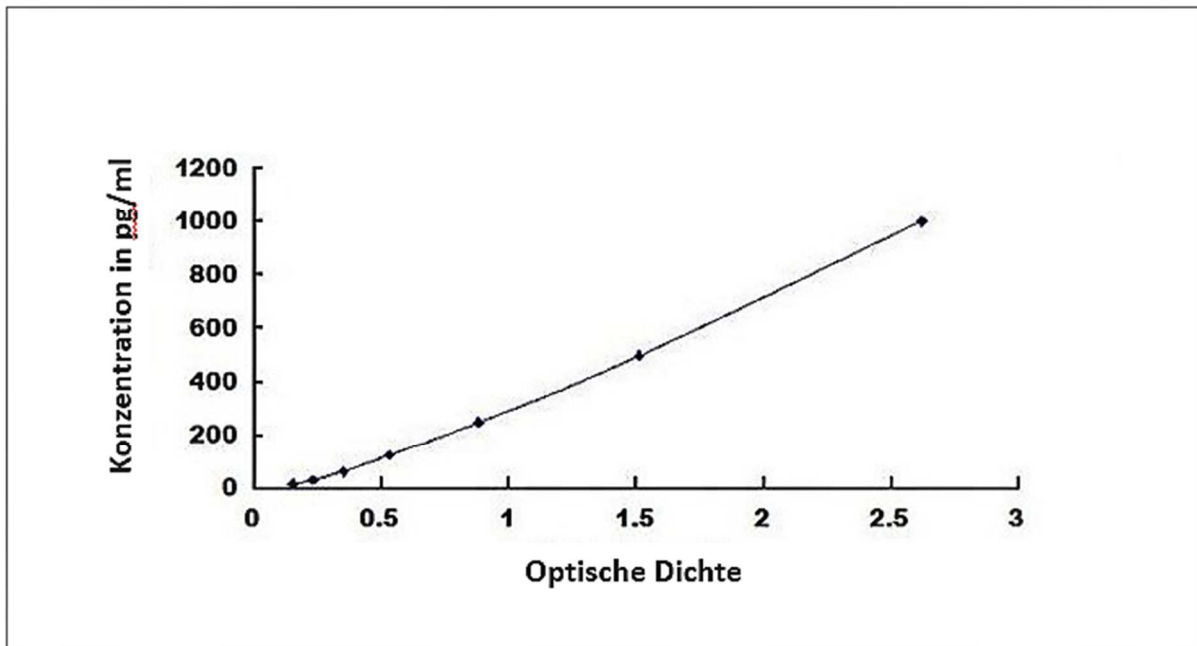
3.5.2 Durchführung der Assays

Die aus dem Patientengut gewonnenen Proben und die Bestandteile des Kits wurden auf Raumtemperatur erwärmt (18-25°C). Aus einer Standardlösung mit einer Konzentration von 1000pg/ml für IL-1 β , 100ng/ml für die MMPs, 500 pg/ml für TNF α sowie 40 ng/ml für die TIMPs wurde eine Verdünnungsreihe von sieben Lösungen hergestellt. Die Reagenzien A und B wurden nach Herstellerangaben zentrifugiert und angemischt. Das Konzentrat an 20 ml Waschlösung wurde mit Hilfe von destilliertem Wasser auf 600ml verdünnt. Zum Abschluss der Vorbereitung wurde die benötigte Menge an TMB Substratlösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) mit einer sterilen Pipette aufgezogen.

Zum Durchführen der Testreihen wurden die Wells für den Standard, die Probe und den Probenleerwert festgelegt, mit je 100 μ l der entsprechenden Lösung befüllt und anschließend für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nun erfolgte nacheinander das Auftragen, Inkubieren und Waschen mit den Reagenzien A und B sowie der Substratlösung. Durch das Auftragen von 50 μ l Stopplösung wurde die Reaktion beendet und das Ergebnis konnte photometrisch ausgewertet werden. Zu diesem Zweck wurde ein Mikrotiterplatten-Leser mit einer maximalen Bandbreite von 10 nm und einem optischen Dichtebereich (O.D.) von 0 bis 3 bei 450 nm verwendet (ELISA microplate reader, Tecan, Switzerland)⁹ (siehe Anhang: Fußnoten). Die Ermittlung der Konzentrationen der gesuchten Parameter in den Proben erfolgte unter Verwendung einer umgedrehten Standardkurve (siehe Abb. 4).

Abb. 4 Typische Standardkurve für IL-1 β als Beispiel für die Equine ELISA-kits:

Der photometrisch gemessenen Dichte (Abszissenachse) der angefertigten Lösung wird eine entsprechende Konzentration der gesuchten Proteine in pg/mL (Koordinatenachse) zugeordnet.



Die optischen Dichten des Standards, des Leerwertes und der Proben wurden mehrfach abgelesen und ein jeweiliger Mittelwert errechnet. Anschließend wurden diese Werte in ein Koordinatensystem eingetragen, wobei die optische Dichte auf der Abszissenachse gegen die Konzentration in pg bzw. ng/ml je nach Verdünnungsreihe der Standardlösung auf der Koordinatenachse dargestellt wurde. Die Konzentrationen der Standardkurve, entsprechend der Verdünnungsreihen, betragen demnach beispielsweise für das IL-1 β 1000pg/ml, 500 pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml und 15,6 pg/ml (siehe Abb. 4). Für TNF α waren es 500 pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml, 15,6 pg/ml und 7,8 pg/ml. Die niedrigste nachweisbare Konzentration an IL-1 β liegt bei etwas unter 5,7 pg/ml und die von TNF α bei 2,9 pg/ml. Die Sensitivität dieser Assays, beziehungsweise die niedrigste Nachweisgrenze der Entzündungsmarker, wurde definiert als die geringste Konzentration an Proteinen, die sich von 0 unterscheiden ließ (siehe Tab. 3). Festgelegt wurde sie, indem zwei Standardabweichungen dem durchschnittlichen Wert der optischen Dichte von 20 Wiederholungen des 0-Standards hinzugefügt wurden und die damit korrespondierende Konzentration ermittelt wurde.

Tab. 3 Spezies, Nachweisgrenze und Detektionsbereich der ELISA-kits:

Die Sensitivität der Pferde-spezifischen Assays (niedrigste Nachweisgrenze der Proteine) wurde definiert als die geringste Konzentration an Proteinen, die sich von 0 unterscheiden ließ. Details der Hersteller werden in den Fußnoten genannt.

| Parameter | Spezies | Nachweisgrenze | Detektionsbereich |
|---|---------|----------------|-------------------|
| MMP-2 ^a | Pferd | 0.56 ng/ml | 1.56 – 100 ng/ml |
| MMP-8 ^b | Pferd | 18 pg/ml | 93 - 6000 pg/ml |
| TIMP-1 ^c | Pferd | 0.241 ng/ml | 0.625 – 40 ng/ml |
| TIMP-2 ^d | Pferd | 3.1 ng/ml | 7.8 – 500 ng/ml |
| IL-1β ^e | Pferd | 5.7 pg/ml | 15.6 - 1000 pg/ml |
| TNF-α ^f | Pferd | 2.9 pg/ml | 7.8 – 500 pg/ml |

3.6 Statistik

Für die statistische Auswertung im Institut für Veterinär-Epidemiologie und Biometrie der Freien Universität Berlin wurden die Programme Excel und SPSS Statistics® (Version 25) für Windows verwendet. Die einzelnen numerischen Parameter wurden als Medianwerte (x_M), arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung (\pm SD) angegeben. Als statistische numerische Variable oder in Form von prozentualen Anteilen der jeweils untersuchten Parameter erfolgte der Vergleich der Textvariablen. Die Überprüfung auf Normalverteilung fand mit Hilfe visueller Inspektion und des Shapiro-Wilk-Tests statt. Um eine Normalverteilung der Daten zu erreichen, wurden die Zytokin-, MMP- und TIMP-Konzentrationen im Plasma und in der Peritonealflüssigkeit auf der Basis von 10 logarithmiert. Ein allgemeines, lineares Regressionsmodell wurde verwendet, um den Einfluss des Sepsis-Scores, der Rasse, des Geschlechts, des Alters und des Körpergewichts auf die Zytokin-, MMP- und TIMP-Konzentrationen im Plasma bzw. in der Peritonealflüssigkeit zu untersuchen. Zur Eliminierung von Variablen, die nicht wesentlich zum Modell beigetragen haben, kam die schrittweise Rückwärtsauswahl zum Einsatz. Bezogen auf die TIMPs blieb daher bei der Analyse der Peritonealflüssigkeit nur das Geschlecht und bei der Untersuchung des Plasmas lediglich das Alter im finalen Modell. Die Signifikanz wurde mit $P < 0.05$ definiert. Des Weiteren wurden

multivariable ANOVA Modelle angepasst, um den Einfluss des Sepsis-Scores, Geschlechts, Alters, Körpergewichts sowie der MMP-, TIMP- und Zytokin-Konzentration auf das Totalprotein, den Hämatokrit, Laktatwert oder das Fibrinogen im Blut beziehungsweise den Totalprotein- und Laktatgehalt im Bauchhöhlenpunktat zu ermitteln. Zur Errechnung der Grenzwerte für Zytokin-, MMP- und TIMP-Konzentrationen mit der höchsten Sensibilität und Spezifität bezüglich der Detektion eines Sepsis-Scores > 10 wurde eine ROC-Analyse durchgeführt (siehe Abb. 5). Ein solcher Grenzwert wird als optimal angesehen, wenn er eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweist. Die Diskriminierungskraft der einzelnen Parameter, die zur Bewertung der Sepsis beigetragen haben, wurde unter Verwendung der linearen Diskriminanzanalyse untersucht. Mittels dieser Methode kann bestimmt werden, welche der Parameter gut geeignet sind, um zwischen den einzelnen Bewertungsgruppen der Sepsis zu unterscheiden. Zur Identifizierung von Variablen, die zwischen den Gruppen ausreichend variieren (p -Wert $< 0,05$), wurde der Gleichheitstest der Gruppenmittel verwendet. Die Bewertung der Funktionen erfolgte mittels ihres prozentualen Varianzanteils, des Eigenwerts, der auf die Funktion zurückzuführen ist, und mit Hilfe des jeweiligen p -Wertes von Wilks Lambda. Die standardisierten kanonischen Diskriminanzfunktionskoeffizienten wurden genutzt, um die mittleren Diskriminanzkoeffizienten zu errechnen, die den Einfluss der Variablen auf die Sepsis-Bewertungsgruppen begründen.

4 Ergebnisse

4.1 Sepsis Score

Zwischen März 2017 und Januar 2018 erfolgte im Rahmen dieser Dissertation die Untersuchung und Beprobung von 47 Pferden, welche aufgrund von abdominalen Schmerzen in der Pferdeklinik der FU Berlin vorgestellt wurden. Unter ihnen befanden sich 26 Warmblutpferde, zehn Ponys, fünf Quarter Horses, zwei Traber sowie vier Vollblüter oder Vollblut-Rassemixe. Die Geschlechtsverteilung umfasste 26 Stuten, 15 Wallache und sechs Hengste. Das durchschnittliche Alter lag bei $14,3 \pm 7,9$ Jahren, das durchschnittliche Körpergewicht bei 512 ± 135 Kg. Von den 47 Pferden mit einer akuten Kolik wurden 27 konservativ therapiert, 16 operiert und vier Tiere euthanasiert.

Bezogen auf den Sepsis Score wurden 32 Pferde als „negativ“ klassifiziert ($\leq 6/19$ Punkte), neun als „fraglich“ 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 „fraglichen“ $7,6 \pm 0,7$ und die aus der „positiven“ Klassifizierung $11,3 \pm 2,0$ Punkte (siehe Tab. 4). Eine Übersicht der einzelnen Parameter des Sepsis Scores in der „positiven“, „fraglichen“ und „negativen“ Sepsis Gruppe gewährt die Tabelle 2.

Tab. 4 Ergebnisse des Sepsis-Scores in den Gruppen „negativ“ (n = 32, $\leq 6/15$ Punkte), „fraglich“ (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) |
| Gesamt-scoring | 3 (2 – 4) | 8 (7 – 8) | 10 (10 – 12) * |

Alle sechs Pferde mit einem „positiven“ Sepsis Score bedurften entweder einer chirurgischen Versorgung (4/6) oder mussten aufgrund des Schweregrades des Krankheitsverlaufs bei nicht erteilter Operationserlaubnis euthanasiert werden (2/6). Von den operierten Patienten wiesen alle (4/4) eine ischämische Darmläsion auf. Drei der vier Pferde, die einem chirurgischen Eingriff unterzogen wurden, konnten bei gutem Allgemeinbefinden entlassen werden. Ein Pferd (1/4) erlitt einen postoperativen Ileus. Da sich dessen Besitzer gegen eine Relaparotomie entschieden, musste auch dieses Tier euthanasiert werden.

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. Fügt 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.

4.2 MMP-2 und MMP-8

In der Sepsis- „negativen“ Gruppe lag die durchschnittliche Konzentration an MMP-2 im Plasma bei 55,3 (42,3–72,1) ng/ml und im Bauchhöhlenpunktat bei 7,8 (0,0–23,90) ng/ml. In der „fraglichen“ Gruppierung sank die durchschnittliche Konzentration im Plasma auf 47,0 (31,6–52,1) ng/ml und in der Peritonealflüssigkeit stieg sie auf 11,4 (1,3–24,0) ng/ml. In der Sepsis- „positiven“ Kohorte wurden mit einer mittleren Konzentration von 69,4 (54,7–84,4) ng/ml im Plasma und 37,7 (0,0–90,4) ng/ml in der Bauchhöhlenflüssigkeit die höchsten Werte erzielt (siehe Tab. 5). Insgesamt konnte kein statistisch signifikanter Unterschied bezogen auf die Konzentrationen aus dem Plasma oder Bauchhöhlenpunktat zwischen den einzelnen Sepsis-Gruppen festgestellt werden ($P > 0,05$).

Die Messungen der MMP-8-Konzentrationen im Plasma und in der Peritonealflüssigkeit ergaben ausschließlich sehr niedrige Werte. In der Sepsis- „negativen“ Gruppe waren es 0,80 (0,00–1,99) ng/ml im Plasma und 0,00 (0,00–0,30) ng/ml im Bauchhöhlenpunktat, in der „fraglichen“ Sepsis-Kohorte 1,60 (0,45–2,40) ng/ml im Plasma und 0,29 (0,00–0,75) ng/ml im Bauchhöhlenpunktat sowie in der „positiven“ Sepsis-Gruppierung immerhin 1,79 (0,00–5,47) ng/ml im Plasma und 0,05 (0,00–1,85) ng/ml in der Peritonealflüssigkeit. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Sepsis-Gruppen ließ sich auch hier nicht feststellen ($P > 0,05$). Eine Übersicht der Werte für die Konzentrationen an MMPs im Plasma und in der Peritonealflüssigkeit ist der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tab. 5 Ergebnisse der Konzentrationen von MMP-2 und MMP-8:

Matrixmetalloproteinasen im Plasma und Bauchhöhlenpunktat in der Sepsis “negativen” ($n = 32$, $\leq 6/19$ Punkte), “fraglichen” ($n = 8$, $7-9/19$ Punkte) oder “positiven” ($n = 6$, $\geq 10/19$ Punkte) Gruppe, Median (Unteres Quantil – Oberes Quantil)

| Parameter | Negativ | Fraglich | Positiv |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|
| MMP-2 [ng/ml] Plasma | 55,3 (42,3 – 72,1) | 47,0 (31,6 – 52,1) | 69,4 (54,7 – 84,4) |
| MMP-2 [ng/ml] Peritonealflüssigkeit | 7,8 (0,0 – 23,90) | 11,4 (1,3 – 24,0) | 37,7 (0,0 – 90,4) |
| MMP-8 [ng/ml] Plasma | 0,80 (0,00 – 1,99) | 1,60 (0,45 – 2,40) | 1,79 (0,00 – 5,47) |
| MMP-8 [ng/ml] Peritonealflüssigkeit | 0,00 (0,00 – 0,30) | 0,29 (0,00 – 0,75) | 0,05 (0,00 – 1,85) |

4.3 TIMP-1 und TIMP-2

Die Konzentrationen von TIMP-1 in der „negativen“ Sepsis-Gruppe lagen bei 472,4 (289,4–765,1) ng/ml im Plasma und 223,7 (180,4–272,9) ng/ml im Bauchhöhlenpunktat. In der „fraglichen“ Gruppierung betragen sie 723,5 (357,7–1295,2) ng/ml im Plasma und 204,7 (188,1–389,2) ng/ml in der Peritonealflüssigkeit. Für die „positive“ Kohorte konnten mit 907,2 (755,6–1114,3) ng/ml im Plasma und 512,9 (448,2–1024,4) ng/ml in der Bauchhöhlenflüssigkeit die höchsten Werte gemessen werden (siehe Tab. 6).

Für TIMP-2 konnten in der „negativen“ Sepsis-Gruppierung Konzentrationen von 86,5 (63,9–265,0) ng/ml im Plasma und 0,0 (0,0–30,1) ng/ml in der Peritonealflüssigkeit ermittelt werden. In der „fraglichen“ Sepsis-Gruppe wurde im Plasma eine Konzentration von 98,3 (0,0–139,2) ng/ml und im Bauchhöhlenpunktat eine von 0,0 (0,0–0,0) gemessen. Die Konzentration im Plasma lag in der „positiven“ Sepsis-Kohorte bei 133,7 (61,2–360,2) ng/ml und in der Peritonealflüssigkeit bei deutlich erhöhten 25,2 (0,0–285,3) ng/ml. Für die TIMP-1 und -2 Konzentrationen im Plasma und Bauchhöhlenpunktat ließ sich ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Sepsis-Gruppen feststellen. Eine Übersicht der Werte für die Konzentrationen an TIMPs im Plasma und in der Peritonealflüssigkeit ist der Tabelle 6 zu entnehmen.

Tab. 6 Ergebnisse der Konzentrationen von TIMP-1 und TIMP-2:

TIMP-Konzentrationen im Plasma und Bauchhöhlenpunktat in der Sepsis “negativen” (n = 32, ≤ 6/19 Punkte), “fraglichen” (n = 8, 7-9/19 Punkte) oder “positiven” (n = 6, ≥ 10/19 Punkte) Gruppe, Median (Unteres Quantil – Oberes Quantil), keine signifikanten Unterschiede

| Parameter | Negativ | Fraglich | Positiv |
|---|-----------------------|------------------------|------------------------|
| TIMP-1 [ng/ml] Plasma | 472,4 (289,4 – 765,1) | 723,5 (357,7 – 1295,2) | 907,2 (755,6 – 1114,3) |
| TIMP-1 [ng/ml] Peritonealflüssigkeit | 223,7 (180,4 – 272,9) | 204,7 (188,1 – 389,2) | 512,9 (448,2 – 1024,4) |
| TIMP-2 [ng/ml] Plasma | 86,5 (63,9 – 265,0) | 98,3 (0,0 – 139,2) | 133,7 (61,2 – 360,2) |
| TIMP-2 [ng/ml] Peritonealflüssigkeit | 0,0 (0,0 – 30,1) | 0,0 (0,0 – 0,0) | 25,2 (0,0 – 285,3) |

4.4 IL-1 β and TNF- α

Für IL-1 β und TNF- α wurden ausschließlich sehr niedrige Konzentrationen in den gewonnenen Proben ermittelt. In der Sepsis- „negativen“ Gruppe waren es beim IL-1 β 2,26 (2,20–2,50) pg/ml im Plasma und 2,40 (2,23–2,68) pg/ml im Bauchhöhlenpunktat, in der „fraglichen“ Sepsis-Kohorte 2,20 (1,60–2,20) pg/ml im Plasma und 2,45 (1,68–2,57) pg/ml im Bauchhöhlenpunktat sowie in der „positiven“ Sepsis-Gruppierung 2,29 (2,20–2,34) pg/ml im Plasma und 2,59 (2,42–2,95) pg/ml in der Peritonealflüssigkeit (siehe Tab. 7). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Sepsis-Gruppen ließ sich auch hier nicht feststellen.

Die Konzentrationen an TNF- α lagen in der „negativen“ Sepsis-Gruppe bei 7,9 (7,9–13,0) pg/ml im Plasma und 7,9 (7,9–8,1) pg/ml im Bauchhöhlenpunktat, in der „fraglichen“ Sepsis-Kohorte bei 7,9 (6,7–7,9) pg/ml im Plasma und 7,9 (6,7–10,5) pg/ml in der Peritonealflüssigkeit sowie bei 8,9 (7,9–32,3) pg/ml im Plasma und 22,1 (7,9–34,2) pg/ml in der Bauchhöhlenflüssigkeit in der „positiven“ Sepsis-Gruppierung. Auch bei der Quantifizierung dieser Zytokine konnte kein statistischer Unterschied zwischen den verschiedenen Sepsis-Gruppen detektiert werden. Eine Übersicht über die IL-1 β and TNF- α Konzentrationen der verschiedenen Sepsis-Kohorten im Plasma und in der Peritonealflüssigkeit ist der Tabelle 7 zu entnehmen.

Tab. 7 Ergebnisse der Konzentrationen von TNF- α und IL-1 β :

Zytokine im Plasma und Bauchhöhlenpunktat in der Sepsis „negativen“ (n = 32, \leq 6/19 Punkte), „fraglichen“ (n = 8, 7-9/19 Punkte) oder „positiven“ (n = 6, \geq 10/19 Punkte) Gruppe, Median (Unteres Quantil – Oberes Quantil), keine signifikanten Unterschiede

| Parameter | Negativ | Fraglich | Positiv |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|
| TNF-α [pg/ml] Plasma | 7,9 (7,9 – 13,0) | 7,9 (6,7- 7,9) | 8,9 (7,9 – 32,3) |
| TNF-α [pg/ml] Peritonealflüssigkeit | 7,9 (7,9 – 8,1) | 7,9 (6,7 – 10,5) | 22,1 (7,9 – 34,2) |
| IL-1β [pg/ml] Plasma | 2,26 (2,20 – 2,50) | 2,20 (1,60 – 2,20) | 2,29 (2,20 – 2,34) |
| IL-1β [pg/ml] Peritonealflüssigkeit | 2,40 (2,23 – 2,68) | 2,45 (1,68 – 2,57) | 2,59 (2,42 – 2,95) |

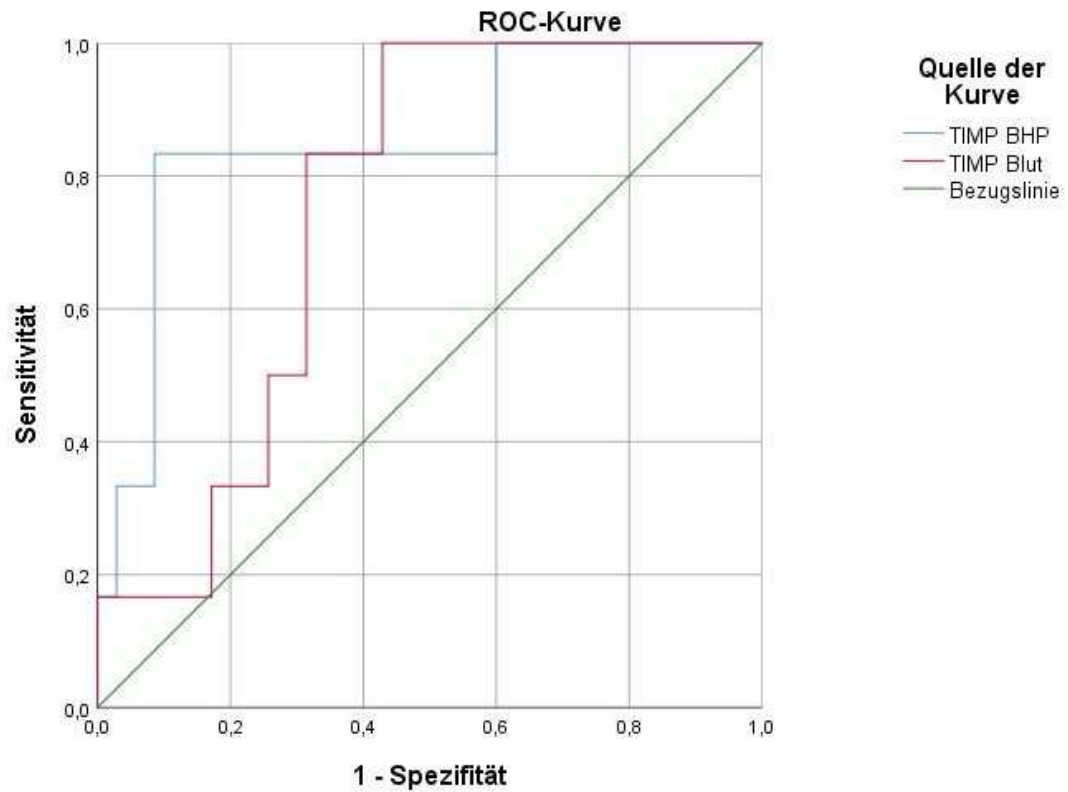
4.5 Statistische Resultate

Das Alter der Probanden hatte einen statistisch signifikanten Einfluss auf die zur Basis zehn logarithmierten Werte der TIMP-Konzentrationen im Blut ($p = 0,038$), die TIMP-2 Konzentration im Bauchhöhlenpunktat ($p=0,026$), die quantifizierte Menge an TNF- α im Plasma ($p=0,009$) sowie einen tendenziell signifikanten Einfluss ($p=0,063$) auf die Konzentration von TNF- α in der Peritonealflüssigkeit. Die zur Basis zehn logarithmierten Werte der TIMP-Konzentrationen im Bauchhöhlenpunktat wurden außerdem signifikant durch den Gesamt-Score beeinflusst ($p = 0,018$). Bezogen auf die Werte aus dem Plasma konnte sowohl für TIMP-1 als auch das Alter der Pferde eine signifikante Assoziation zum Hämatokrit nachgewiesen werden ($p = 0,024$, $p = 0,002$). TIMP-1 korrelierte negativ mit dem gemessenen Hämatokrit (Regressionskoeffizient 9,447), wohingegen ein höheres Alter einen positiven Effekt bewirkte (Regressionskoeffizient 0,034). Des Weiteren wurde der Laktatwert im Blut durch das Körpergewicht beeinflusst ($p = 0,010$, Regressionskoeffizient 0,002). Für das Gesamteiweiß konnten keine statistisch signifikanten Faktoren identifiziert werden.

Bezüglich der Konzentrationen an MMP-2, MMP-8, TIMP-2, IL-1 β und TNF- α im Plasma oder Bauchhöhlenpunktat konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Sepsis-Gruppen ausgemacht werden. Die acht Parameter, welche zur Klassifizierung der Patienten in septisch ($\geq 10/19$ Punkte) oder nicht septisch ($\leq 9/19$ Punkte) beziehungsweise zur Einteilung in die Subgruppen "positiv", "fraglich" oder "negativ" dienten, wiesen ebenfalls keine Korrelationen zu den oben genannten Entzündungsmediatoren auf. Zwischen den Werten für MMP-8 und Laktat im Plasma gab es eine positive Assoziation in dem Sinne, dass bei Anstieg des einen, der andere Wert ebenfalls größer wurde. Dieser Zusammenhang war allerdings nicht signifikant ($p = 0,088$). Ein derartiger Trend ließ sich auch für IL-1 β und Laktat im Bauchhöhlenpunktat beobachten ($p = 0,053$). Bezüglich der Konzentrationen an IL-1 β und dem Gesamteiweiß in der Peritonealflüssigkeit bestand eine statistisch signifikante positive Assoziation ($p = 0,023$). Die ROC Analyse zur Ermittlung des optimalen Grenzwertes für TIMP-1 Konzentrationen mit dem Ziel septische Probanden ($\geq 10/19$ Punkte) zu identifizieren, ergab für TIMP-1 im Bauchhöhlenpunktat eine Sensitivität von 83,3 % und einer Spezifität von 91,4 % bei 374 ng/ml. Bezüglich TIMP-1 im Plasma befand sich der optimale Grenzwert mit einer Sensitivität von 100 % und einer Spezifität von 57,1 % bei 541 ng/ml (siehe Abb. 5).

Abb. 5 ROC Graph zur Darstellung der Sensitivität und Spezifität von TIMP-1

Für die gemessenen Konzentrationen an TIMP-1 im Bauchhöhlenpunktat und Plasma wurden die Sensitivität und Spezifität, mit derer sich septische Probanden identifizieren ließen, bestimmt.



5 Diskussion

Zwischen März 2017 und Januar 2018 wurden 47 Pferde mit Koliksymptomen divergierenden Schweregrads und unterschiedlicher Genese im Rahmen dieser Promotionsarbeit in der Pferdeklinik der Freien Universität Berlin untersucht und beprobt. Die Auswahl der Koliker erfolgte nach dem Zufallsprinzip entsprechend ihrer Vorstellung in der Klinik innerhalb dieses Zeitraums ohne methodische Systematik. Erwartungsgemäß war die von uns untersuchte Studienpopulation bezogen auf das Alter, die Rasseverteilungen und das Körpergewicht als repräsentativ für unsere Klinik anzusehen. Lediglich beim Geschlecht gab es mit knapp 15% überdurchschnittlich viele Hengste unter den Probanden. Dieser Umstand dürfte allerdings keinen Einfluss auf die Studienergebnisse genommen haben.

Die zu untersuchenden Hypothesen bestanden in der Annahme, dass die erhöhte Permeabilität der Darmwände im Zuge eines Kolikgeschehens zu einer durch gramnegative Bakterien aus dem Gastrointestinaltrakt verursachten Endotoxämie bei Equiden führt, welche quantifizierbare Erhöhungen der Aktivitäten von Zytokinen im Plasma oder Bauchhöhlenpunktat der betroffenen Pferde bewirkt. Außerdem galt es zu eruieren, ob Strangulationen bzw. Darmverschlüsse bei kolikenden Pferden aufgrund von elastolytischen und kollagenolytischen Dysbalancen Fibrosierungen des Darms verursachen, die sich in der vermehrten, messbaren Produktion von Matrix-Metalloproteinasen manifestieren.

Der Sepsis-Score nach Breuer und Schusser zur Detektion endotoxämischer Patienten wurde zum Zweck der besseren Umsetzbarkeit während des Notdienstes auf die Beurteilung des klinischen Bildes und die Erhebung zweier Laborparameter (Leukozytenzahl in G/l und ionisiertes Kalzium in mmol/l) reduziert. Die durchgeführte Diskriminanzanalyse zeigt jedoch, dass nicht nur alle von uns generierten Parameter (außer dem ionisierten Kalzium) zur Unterscheidung in die drei Sepsis-Gruppen beitragen, sondern, dass vermutlich eine weitere Reduzierung möglich wäre. Bei der alleinigen Bewertung der Maulschleimhaut, des Allgemeinbefindens und der Leukozytenanzahl würde das Risiko für Fehlklassifikationen in die Sepsis Gruppen nur sehr gering ansteigen. Ein konkreter Infektions-Nachweis in Form von Blutkulturen beziehungsweise ein direkter Nachweis von Endotoxinen in der jeweiligen Probenflüssigkeit per PCR oder gar deren Quantifizierung durch beispielsweise einen (End-point chromogenic LAL) Assay als eine Art Goldstandard oder Bezugswert fanden nicht statt. Der Einsatz entsprechender Verfahren zum direkten Nachweis des Vorliegens einer Sepsis könnte bei zukünftigen Forschungsprojekten, welche das Verhalten von

Entzündungsparametern in der Gegenwart einer Endotoxämie beim Pferd thematisieren, Anwendung finden.

Die Analysen von MMP-2 und MMP-8, deren Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 sowie der Entzündungsmediatoren IL-1 β und TNF- α ergaben keinen statistisch signifikanten Unterschied bezogen auf die Quantifizierungen aus dem Plasma oder Bauchhöhlenpunktat zwischen den einzelnen Sepsis-Gruppen. Ein Zusammenhang zwischen den gemessenen Konzentrationen der im Rahmen dieser Promotionsarbeit analysierten Biomarker zu dem Schweregrad der klinischen Anzeichen beziehungsweise den Laborbefunden konnte nicht festgestellt werden. Weder die Vermutung, dass Koliken bei Equiden zu Endotoxämien führen, welche ihrerseits messbare Erhöhungen der Aktivitäten von Zytokinen im Plasma oder Bauchhöhlenpunktat von Pferden bewirken, noch die Annahme einer elastinolytischen/kollagenolytischen Dysbalance bei kolikenden Pferden, die sich in der vermehrten Produktion von Matrix-Metalloproteinasen manifestiert, konnte somit bestätigt werden.

Die einfachste Erklärung für dieses Resultat wäre eine mangelnde Sensitivität der ausgewählten ELISA-kits. Tatsächlich stellte es sich als relativ schwierig heraus, spezifische Assays mit nativen Pferde- Proteinen für die Quantifizierung der gesuchten Parameter aus unseren Proben zu finden. Der ELISA für MMP-9, welcher Bestandteil der 2021 von Barton et al. veröffentlichten Studie bezüglich dessen erfolgreichem Einsatz als Biomarker für Endotoxämien bei Kolikern war, ist der einzige wirklich „Pferde-spezifische“ Assay für die Quantifizierung von MMPs bei Pferden (Barton et al. 2021). Zum einen ist diesem Sandwich-ELISA ein natives MMP-9 Antigen als Standard immanent; zum anderen wurde seine Sensitivität mittels Zymographie als Goldstandard bei Pferden, die an Equinem Asthma litten, verifiziert (Barton et al. 2015). Die von uns verwendeten Kits beruhen alle auf der Benutzung von rekombinanten Proteinen als immunisierende Antigene und ELISA -Standards. Nichtsdestotrotz wurde die effektive Anwendung dieser Assays bei vorherigen Studien bereits unter Beweis gestellt (Barton et al. 2016; Barton et al. 2015). Außerdem wurden alle Kits als Pferde-spezifische Tests von den Herstellern verkauft und auf Nachfrage als diesbezüglich validiert deklariert. Um die mangelnde speziesspezifische Sensitivität der ELISA-kits als Ursache für die fehlenden statistischen Korrelationen auszuschließen, hätte beispielsweise eine zymographische Bestimmung der Aktivität der gesuchten Enzyme stattfinden müssen. Für den klinischen Einsatz von ELISA-kits zur Messung von MMPs oder TIMPs bei equinen Patienten gibt es derzeit keine Lösung, da aktuell keine vollständig validierten speziesspezifischen Assays (außer für MMP-9) erhältlich sind.

Eine weitere mögliche Ursache für die geringen Konzentrationen und Sepsis-spezifischen Korrelationen der gemessenen Biomarker könnte in dem geringen Schweregrad der Erkrankungen der Probanden begründet liegen. Die Anzahl von 47 zu untersuchenden Pferden wurde bei der Versuchsplanung zunächst als ausreichend eingeschätzt, um aussagekräftige Zusammenhänge zwischen einem Kolikgeschehen und der Aktivität von Zytokinen sowie Matrix-Metalloproteinasen im Serum und Bauchhöhlenpunktat zu detektieren. Angesichts der Hypothese, nach derer Endotoxine ursächlich für die initiierte Signalkaskade der von uns quantifizierten Entzündungsparameter sind, erscheinen jedoch nach erfolgter Versuchsdurchführung und -auswertung die sechs „Sepsis – positiven“ Pferde als sehr wenig, um diesbezüglich statistisch aussagekräftige Rückschlüsse zu ziehen. Auch die Überlebensrate unserer Patienten von knapp 91% ist für Pferde, die mit akuten Abdominalschmerzen in eine Klinik überwiesen werden, deutlich höher als der internationale Durchschnitt von ca. 70% (Christophersen et al. 2014). Diese Umstände lassen vermuten, dass in der von uns untersuchten Studienpopulation weniger schwerwiegende Kolik- Verläufe vorkamen als üblich. Ein fortgeschrittenes Krankheitsbild, in Folge dessen Endotoxine und Entzündungsmediatoren im systemischen Blutkreislauf zirkulieren, ist jedoch Voraussetzung für eine Reaktion der Leukozyten, welche daraufhin mit der Sekretion proinflammatorischer Mediatoren wie Zytokine, Chemokine, Enzyme, Sauerstoff- oder Stickstoffradikale reagieren (Pugin et al. 1999). Die von uns vermutete erhöhte Gelatinaseaktivität im Plasma in Gegenwart einer Sepsis beruht ebenfalls auf den Auswirkungen verschiedenster Entzündungsparameter (LPS, TNF- α , IL-8 oder G-CSF), da diese eine Degranulation von polymorphkernigen Leukozyten und damit eine vermehrte Sekretion von Matrixmetalloproteinasen bewirken (Pugin et al. 1999). Vergleicht man den Versuchsaufbau und die Forschungsergebnisse dieser Promotionsarbeit mit anderen wissenschaftlichen Veröffentlichungen zu Zytokinausschüttungen oder Matrixmetalloproteinasenaktivitäten bei Sepsis-assoziierten Krankheitsbildern aus der Human- oder Tiermedizin wird daher deutlich, dass hierbei das Vorhandensein von Lipopolysacchariden im systemischen Kreislauf des erkrankten Organismus als Grundlage für den entwickelten Forschungsansatz herhielt (Sivula et al. 2015; Hoffmann et al. 2006; Lalu et al. 2006; Weiss und Evanson 2002; Pugin et al. 1999). Es ist daher nicht verwunderlich, dass mittels diverser in vitro-Versuche Teilaspekte unserer Hypothesen, nämlich die zunehmende Aktivität oder Produktion von Zytokinen und/oder Matrixmetalloproteinasen in Gegenwart von Endotoxinen, sowohl bei Mensch als auch Tier, bereits belegt werden konnten: Die direkte Eingabe von LPS oder IL-1 β in menschliche Blutproben sorgte für eine Aktivierung (vaskulärer) MMPs, Verschiebung der Balance zwischen MMPs sowie TIMPs und führte so letztlich zu einer vaskulären Dysfunktion (Lalu et al. 2006). Endotoxine und andere Entzündungsparameter (TNF- α , IL-8 oder G-CSF) induzierten in humanem Vollblut eine rasche Freisetzung von Gelatinase-B (MMP-9) (Pugin et

al. 1999) und auch neutrophile Granulozyten von Pferden konnten in vitro durch die Zugabe von Lipopolysacchariden bereits aktiviert werden (Weiss und Evanson 2002). Auch abseits von Forschungsmethoden unter reinen Laborbedingungen wurden derartige Mechanismen bereits nachgewiesen: Die 2006 von Hoffmann et al. gemessenen Konzentrationen an MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 and IL-6 im Plasma von septischen Patienten waren deutlich höher als bei gesunden Probanden. Vor allem die Aktivität von TIMP-1 zeigte sich bei nicht-Überlebenden signifikant stärker und erwies sich diesbezüglich als guter prognostischer Indikator (Hoffmann et al. 2006). Der diagnostische Wert vor allem von TIMP-1 konnte 2014 von Sivula et al. bestätigt werden, als sie befanden, dass die Konzentration dieses „tissue inhibitors of metalloproteinases“ mit dem Schweregrad von Sepsis-assoziierten Koagulopathien im Vergleich zu gesunden Probanden korrelierte (Sivula et al. 2015). Pugin et al. induzierten durch die intravenöse Gabe von Escherichia coli – Bakterien sogar eine experimentelle Sepsis bei ihren Probanden und konnten im Zuge dessen eine vermehrte Gelatinase-Aktivität in deren Plasma feststellen (Pugin et al. 1999). Angesichts dieser zugrundeliegenden Forschungsergebnisse aus der Human- und Veterinärmedizin bezüglich der Auswirkungen von endotoxämischen Zuständen auf die von uns untersuchten Entzündungsmediatoren wäre eine größere „Sepsis- positive“ beziehungsweise „schwerwiegend erkrankte“ Patientengruppe für die Generierung von signifikanten Ergebnissen beziehungsweise die Untersuchung der im Rahmen dieser Promotionsarbeit aufgestellten Forschungshypothesen wünschenswert gewesen.

Einzelne Aspekte der im Zuge dieses Promotionsvorhabens proklamierten Thesen wurden auch in der Pferdemedizin bereits verifiziert, als Arosalo et al. feststellten, dass die MMP-2 Aktivität von Kolikern im Plasma statistisch signifikant höher war als bei gesunden Kontrolltieren. Der Unterschied zwischen ihren Probanden und unserer Studienpopulation bestand auch hier eindeutig im Schweregrad der Erkrankung. Die untersuchten Pferde hatten zum Zeitpunkt der Messung bereits ein Kolikgeschehen von über 12, 24 oder sogar 72 Stunden hinter sich und bedurften allesamt einer chirurgischen Versorgung, was die Vermutung nahelegt, dass sie sich bereits in einem endotoxämischen Zustand befanden (Arosalo et al. 2007). Die Forschungsergebnisse von Barton und Collatos stehen ebenfalls in einem gewissen Widerspruch zu unseren fehlenden Korrelationen, da es ihnen gelang, statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen der Aktivität von TNF- α (und IL-6) im Bauchhöhlenpunktat sowie Plasma und dem vorherrschenden Kolikgeschehen ihrer Probanden zu detektieren. Bei genauerer Analyse des Versuchsaufbaus und der erzielten Resultate erklärt sich jedoch dieser Unterschied in den Ergebnissen trotz ähnlicher zugrundeliegender Hypothese. Vor allem der Schweregrad der Erkrankungen, aber auch die Tatsache, dass eine direkte Quantifizierung der Endotoxine zur Generierung einer Art

Referenzwert stattfand, scheinen bei Betrachtung der Forschungskonklusionen und angesichts der zu Beginn dieser Diskussion erwähnten Grundlagenforschung bezüglich der Auswirkungen endotoxämischer Zustände auf diverse Entzündungsparameter eklatant. Eine besonders deutliche Assoziation bestand zwischen der Nachweisbarkeit von Endotoxinen in einer Probenflüssigkeit und den gemessenen Zytokinen aus derselben Probe. Nicht erhöhte Messwerte erwiesen sich als gut geeignet für die Prognose einer erfolgreichen Rehabilitation. Des Weiteren war die diagnostische Genauigkeit der Zytokin-Bestimmung ausgesprochen sicher in Bezug auf die Vorhersage von letalen Krankheitsverläufen, welche bei unserem Versuch lediglich vier Pferde betrafen. Besonders hoch waren die Aktivitäten der Zytokine im Plasma bei Pferden, die eine Ruptur des Gastrointestinaltraktes erlitten. Eine derartige Diagnose konnte bei keinem unserer Probanden mit abschließender Sicherheit gestellt wurde.

Auch der Messzeitpunkt könnte auf verschiedenste Weise die gewonnenen Ergebnisse beeinflusst haben. Bezüglich der Gewinnung des Probenmaterials wurde zwar eine zeitliche Vereinheitlichung angestrebt (bei Erstuntersuchung direkt nach Vorstellung des Patienten, Dauer ca. 30 Minuten), da jedoch nicht erhoben wurde, wie lange die Pferde im heimischen Stall bereits an Koliksymptomen litten, lässt sich schwer abschätzen, in welchem Stadium der Pathoätiologie des Kolikgeschehens sie sich bei ihrer Ankunft in der Klinik befunden haben. Weitere Messungen während der Therapie, Rekonvaleszenz oder auch bei Komplikationen im Heilungsverlauf wurden nicht durchgeführt. Die Tatsache, dass bei schwerwiegenden Krankheitsverläufen (Sepsis positiven Probanden) sowohl MMP-Erhöhungen als auch eine vermehrte Zytokinproduktion aus unseren Ergebnissen abzulesen sind, aber auch bereits durch andere veterinärmedizinische Forschungsarbeiten nachgewiesen wurden (Arosalo et al. 2007; Barton und Collatos 1999), lässt höhere Werte zu einem späteren Zeitpunkt des Kolikgeschehens vermuten. Aus der Humanmedizin gibt es ebenfalls entsprechende Forschungsergebnisse, welche diesen Ansatz stützen: Bei Pugin et al. stellte sich das maximale Plasmalevel von proMMP-9 (eine inaktive Vorläuferstufe der entsprechenden Matrix-Metalloproteinasen) erst eineinhalb bis drei Stunden nach der intravenösen Gabe von Lipopolysacchariden ein (Pugin et al. 1999). Patienten, die an einer Sepsis-assoziierten Gerinnungsstörung litten, wiesen erst am zweiten Tag nach dem Auftreten einer disseminierten intravasalen Koagulopathie eine erhöhte Konzentration von MMP-8 im Serum auf (Sivula et al. 2015). Eine Begründung für diese „späte“ Reaktion der Matrix-Metalloproteinasen lässt sich aus ihrer Funktion beim Umbau des Extrazellularraumes herleiten. Extrazelluläres Remodeling ist ein wichtiger Bestandteil zellulärer und struktureller Integrität von (gesundem) Gewebe (Xie et al. 1994; Lu et al. 2011). Greift man nun die Grundannahme auf, dass die an diesem Prozess mitwirkenden MMP vor allem bei gelatinolytischen/kollagenolytischen Ungleichgewichten durch ihre proteolytische

Degradierung von Komponenten des Extrazellulärraums eine große Rolle spielen, (Lu et al. 2011; Page-McCaw et al. 2007; Gardner und Ghorpade 2003; Brinckerhoff und Matrisian 2002), liegt es nahe, dass ein Erkenntnisgewinn bezüglich deren Funktion/Aktivität bei Umbauprozessen des Extrazellulärraumes in Gegenwart von Adhäsionen und Fibrosierungen im späteren Krankheitsverlauf, eventuell sogar erst bei post-operativen Kolikern, sehr interessant sein könnte. Zu ähnlichen Schlüssen kamen bereits zahlreiche Studien, in denen belegt werden konnte, dass extrazellulärem Remodeling durch MMP-2 und -9 eine wichtige Funktion bei der Ovulation, Unfruchtbarkeit oder auch Risikoträchtigkeit beim Pferd zukommt (Rapacz-Leonard et al. 2015; Oddsdottir et al. 2011; Sessions et al. 2009), dass bei equinem Asthma der Quotient aus MMP-8 und dazugehörigem Inhibitor als guter diagnostischer Indikator für eine kollagenolytische Dysbalance dienen kann (Barton et al. 2016; Barton et al. 2015) oder dass MMP-1 (-2 und -9) eine vermehrte Expression in neoplastischem Gewebe von equinen Sarkoiden aufweist (Mosseri et al. 2014; Yuan et al. 2010). Vor allem die MMP-8, welche im Zuge unserer Analysen bei den „Sepsis-negativen“ und „fraglichen“ Probanden in (noch) kaum nachweisbaren Konzentrationen vorkam, könnte aufgrund ihrer Substratspezifität zu fibrillärem Kollagen (im Gegensatz zur Gelatinase MMP-2) im Laufe eines längeren Krankheitsgeschehens einer vermehrten Produktion unterliegen (Klaus, 2019). Das Wissen um die (Dys-)Balance von MMPs und TIMPs, welche bei chronischen Erkrankungen wie Asthma oder degenerativen Arthritiden (Barton et al. 2015; Fietz et al. 2008) bereits nachgewiesen wurde, könnte perspektivisch beim Management post-operativer Koliker einen wichtigen Beitrag bei den Entscheidungen bezüglich (medikamentöser) Therapie, Prognose, eventueller Relaparotomie und Detektion etwaiger Komplikationen leisten.

Doch nicht nur unser Messzeitpunkt gleich zu Beginn des Klinikaufenthaltes der beprobten Pferde erscheint im Nachhinein fraglich, sondern auch das einmalige, gleichzeitige Bestimmen der Konzentrationen aller drei Klassen an Entzündungsparametern (Zytokine, MMPs, TIMPs). Da die Kaskaden aus Entzündungsparametern sowie die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen fördernden oder hemmenden Einfluss aufeinander zu nehmen vermögen, und die TIMPs ihrerseits die vermehrte Aktivität der MMPs abzufangen versuchen, bleibt zu überlegen, ob die Messung all dieser Faktoren zu ein und dem gleichen Zeitpunkt sinnvoll erscheint. Ihre jeweiligen Peaks müssten in logischer Konsequenz zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgen. Das Festlegen idealer Mess- und auch Verarbeitungszeiträume der Zytokinkonzentrationen wird außerdem durch ihre extrem kurze Halbwertszeit, welche nur im Minutenbereich liegt, die Möglichkeit einer lymphozytären ex-vivo Zytokinsynthese sowie ihre Anfälligkeit für zirkadiane oder stressbedingte Konzentrationsschwankungen verkompliziert (Petrovsky et al. 1998).

Ein weiterer von uns nicht erfasster Faktor, der ebenfalls auf die Messergebnisse Einfluss genommen haben kann, ist die medikamentöse Behandlung der Patienten vor dem Klinikaufenthalt durch den behandelnden Tierarzt. Einem Großteil der Pferde mit akutem Abdominalschmerz werden im Laufe seines Kolikgeschehens Schmerzmittel, oft in der Form eines nicht-steroidalen Antiphlogistikums, verabreicht. Besonders Pferde, die einer chirurgischen Versorgung bedürfen, erhalten außerdem (unter anderem) eine antibiotische Medikation. Dass eine derartige Therapie bei Pferden nicht nur Einfluss auf das Entzündungsgeschehen (und dessen Mediatoren), sondern auch auf die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen hat, wissen wir seit 2013 von Fugler et al. Im Zuge deren Forschungsvorhabens konnte nachgewiesen werden, dass Doxzyklin, Oxytetracyclin, Flunixin-Meglumin und Pentoxifyllin die Produktion von equinen MMP-2 und MMP-9 inhibieren (Fugler et al. 2013). Ob es bei unseren Probanden zu einer Reduzierung der Zytokinaktivität oder MMP-Produktion aufgrund haustierärztlich verabreichter Medikamente kam, lässt sich im Nachhinein aufgrund mangelnder Daten nicht mehr feststellen.

Bei Betrachtung der aufgestellten Hypothesen, der Ätiologie von Endotoxämien bei Kolikern, der im Zuge dieser Promotionsarbeit gewonnenen Ergebnisse und der bisher üblichen Kolik-Diagnostik stellt sich außerdem die Frage, ob die Bestimmung von Zytokinen und MMPs einen tatsächlichen Mehrwert bei akuten Koliken liefern kann oder ihre Analyse sich im späteren Verlauf des Krankheitsgeschehens sinnvoller einsetzen ließe. Da ein Austritt der LPS aus dem Magen-Darmtrakt als ursächlich für den Anstieg der von uns bestimmten Parameter angenommen wird und ein solcher Übertritt nur durch eine geschädigte/minderdurchblutete Darmwand zustande kommt (Lalu et al. 2006; Werners et al. 2005; Barton und Collatos 1999; King und Gerring 1988), würde das Messen von Zytokinen/MMPs keinen (zeitlichen) Vorteil gegenüber der Bestimmung des durch die Hypoxie gestiegenen Laktatwertes darstellen. Es ist daher nicht verwunderlich, dass der geringe Anstieg der von uns gemessenen Konzentrationen an MMP-8 im Plasma und IL-1 β im Bauchhöhlenpunktat von erhöhten Laktatwerten im Plasma begleitet wurde. Sowohl die Analyse des Laktatgehaltes als auch die Feststellung der drei aussagekräftigsten Parameter des Sepsis-Scores (WBC, Maulschleimhaut, Allgemeinbefinden) sind im Klinikalltag deutlich einfacher und kostengünstiger durchzuführen (Breuer und Schusser 2012; Peloso und Cohen 2012; Tennent-Brown 2011; Yamout et al. 2011; Delesalle et al. 2007; Parry et al. 1983). Möchte man dennoch im Akutstadium einer Kolik der Endotoxämie-Frage zu therapeutischen oder prognostischen Zwecken nachgehen und einen Assay verwenden wollen, würde sich die Quantifizierung der Endotoxine selbst (per End-point chromogenic LAL Assay) noch vor der Bestimmung diverser Entzündungsparametern anbieten (Obata et al. 2008; Bates et al. 1998; Lindsay et al. 1989).

Ein Ansatz, der ebenfalls in zukünftigen Projekten Berücksichtigung finden könnte, ist die Entnahme von Proben einer gesunden Kontrollgruppe zum Abgleich der untersuchten Entzündungsparameter. Ableiten ließe sich hieraus, ob die Konzentrationen an IL-1 β und TNF α , MMP-2 und -8 sowie TIMP-1 und -2 aus dem Plasma oder Bauchhöhlenpunktat nicht erkrankter Tiere als eine Art Nullwert fungieren können, oder, ob uns deren Analyse eventuell sogar zunächst paradox erscheinende Ergebnisse offeriert, deren weitere Erforschung neue Erkenntnisse über die komplexen Mechanismen der Signalkaskaden von Entzündungsmediatoren liefert. Entsprechende Vermutungen können beim Vergleich der im Zuge dieses Promotionsvorhabens gewonnenen Resultate mit den Forschungsergebnissen von Barton et al. entstehen, da sich bei deren Untersuchung von Pferden mit akutem Abdomen die Konzentration an MMP-9 im Plasma und Bauchhöhlenpunktat in der Gruppe von Sepsis-fraglichen Pferden als geringer erwies als bei Sepsis-negativen Tieren (Barton et al. 2021). Eine weitere interessante Feststellung gelang 1999 mit der Erkenntnis, dass es keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den gemessenen Werten der Zytokine oder Endotoxine im Plasma und der Peritonealflüssigkeit von kolikenden Pferden gab (Barton und Collatos 1999). Auch bei uns waren überraschenderweise die absoluten Werte der lokalen Konzentrationen aus der Peritonealflüssigkeit bei den „Sepsis-positiven“ Pferden lediglich bezogen auf TNF- α deutlich höher als die Messungen aus dem Plasma respektive systemischen Kreislauf. Dieses Ergebnis steht in einem gewissen Widerspruch zu anderen Forschungsergebnissen aus der Veterinärmedizin, welche die Ermittlung von Entzündungsmarkern in lokalen Proben (im Bauchhöhlenpunktat) im Vergleich zu den gemessenen Konzentrationen im Plasma stets im Vorteil sahen: Beispielhaft stehen hierfür die Messungen von Procalcitonin oder Laktat sowohl in der Peritonealflüssigkeit als auch im Blut von Kolikern (Kilcoyne et al. 2020; Delesalle et al. 2007) sowie die Bestimmung der proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-6, deren Aktivität bei Pferden mit akutem Abdomen im Bauchhöhlenpunktat signifikant höher war als im Plasma (Barton und Collatos 1999). Von anderen Tierarten wie Mäusen sind ebenfalls Mechanismen bekannt, bei denen die Anwesenheit von Lipopolysacchariden zu einer vermehrten Produktion von lokalen Kollagenasen/Gelatinasen aus peritonealen Makrophagen führten (Xie et al. 1994).

Das Heranziehen möglicher Erklärungen für diese Paradoxa verdeutlicht die Komplexität von Subthemen der gesamten Forschungsfrage. Wenn keine Assoziation zwischen der Aktivität von Zytokinen im Bauchhöhlenpunktat und Plasma bei Pferden mit akutem Abdomen ausfindig gemacht werden konnte, handelt es sich dann um zwei lokal abgegrenzte Entzündungsreaktionen oder fand ein Übertritt von entweder Endotoxinen oder Zytokinen aus dem Bauchraum in den Blutkreislauf statt, dessen Regulation (lokal oder systemisch) allerdings die Ermittlung statistischer Zusammenhänge verhinderte?

Bei Betrachtung dieser Fragen wird klar, wie viele mögliche Erklärungen für das Fehlen statistisch relevanter Ergebnisse des vorliegenden Promotionsvorhabens existieren. Sie alle begründen sich aus den besonderen Herausforderungen der klinischen Forschung bei der Untersuchung von komplexen Krankheitsbildern wie „Koliken“, der damit einhergehenden Schwierigkeit beim Gleichschalten von Variablen und den Limitationen, die Klinikalltag, Probandenumfang und begrenzte Forschungsmittel mit sich bringen. Jedes der einzelnen Themengebiete dieser Promotionsarbeit: Kolik, Sepsis/Endotoxine, Zytokine/Entzündungsmediatoren, MMPs/TIMPs unterliegt vielfältigen Einflüssen und kann seinerseits verschiedenste Auswirkungen anregen. Die Kolik als Symptomkomplex für Abdominalschmerz, selbst auf intestinale Erkrankungen reduziert, reicht von leichten Obstipationen über schwere ischämische Zustände bis hin zu Rupturen des Gastrointestinaltraktes. Diese Ätiologien sind zudem nicht statisch voneinander zu trennen, sondern können im Verlauf von einer Form in die andere übergehen bzw. einander bedingen. Definiert man also eine „einheitliche“ Studienpopulation nach dem Vorhandensein von „Koliksymptomen“ erhält man zahlreiche (entzündliche/septisch, nicht entzündliche/nicht septische usw.) Ätiologien, Schweregrade und Krankheitsverläufe (Dukti und White 2009; Cohen 1997; Proudman 1992). Aus dieser unterschiedlichen Grundmenge Rückschlüsse auf Zytokinausschüttungen oder Proteaseaktivitäten von MMPs zu ziehen, ist um ein Vielfaches fehleranfälliger als bei einheitlichen Krankheitsbildern (Loftus et al. 2009), nachgewiesenem Endotoxingehalt (Barton und Collatos 1999) oder gar iatrogenen Zuführung von Endotoxinen per Infusion und anschließender Messung der Zytokinaktivität (Morris et al. 1992; MacKay et al. 1991; Morris et al. 1990b).

Abschließend muss festgestellt werden, dass beide zu Beginn dieser Promotionsarbeit aufgestellten Hypothesen sich in Anbetracht unserer generierten Forschungsergebnisse nicht bestätigen lassen. Es konnte letztendlich weder beantwortet werden, ob durch ein Kolikgeschehen ausgelöste Endotoxämien bei Equiden zu einer messbaren Erhöhung der Aktivitäten von Zytokinen im Plasma oder Bauchhöhlenpunktat der betroffenen Pferde führen, noch ließ sich die Hypothese bestätigen, dass Strangulationen bzw. Darmverschlüsse bei Pferden elastolytische und kollagenolytische Dysbalancen bewirken, die sich durch eine vermehrte Produktion von Matrix-Metalloproteinasen nachweisen lassen .

Angesichts zugrundeliegender Forschungsergebnisse bezüglich der Zusammenhänge von Endotoxämien und Entzündungsmediatoren sowie der Tatsachen, dass sowohl im Bauchhöhlenpunktat als auch im Plasma bei den sechs Sepsis-positiven Pferden die jeweils höchsten absoluten Werte für MMP-2 und MMP-8, TIMP-1 und TIMP-2 sowie IL-1 β und TNF- α gemessen wurden, und, dass die ROC- Analyse von TIMP-1 für die Identifizierung septischer

Probanden eine Sensitivität von 100% bei Werten aus dem Plasma sowie eine Spezifität von > 90% bei Werten aus dem Bauchhöhlenpunktat ergab, liegt die Vermutung nahe, dass bei verbessertem Versuchsaufbau auch statistisch signifikante Assoziationen zwischen Kolikgeschehen, Endotoxinen, Zytokinen und MMPs hätten nachgewiesen werden können.

Ein verbesserter Forschungsansatz zur Klärung der initial erhobenen Hypothesen sollte eine möglichst große Studienpopulation mit einem zunächst vereinheitlichten Krankheitsgeschehen (beispielsweise nur Koliker mit strangulierenden Obstruktionen/einer entsprechend schweren Klinik oder ausschließlich Sepsis-positive Tiere) umfassen. Zusätzlich könnten gesunde Kontrolltiere zur Generierung einer Art Referenzwert bzw. als mögliche Nullgruppe beprobt werden. Unter Umständen empfiehlt es sich sogar, Endotoxine aus dem Blut oder Peritonealraum zum Beispiel per End-point chromogenic LAL Assay direkt zu quantifizieren und zu den gemessenen Entzündungsparametern in Relation zu setzen (Obata et al. 2008; Bates et al. 1998; Lindsay et al. 1989). Die Gabe von Medikamenten vor der Probengewinnung sollte methodisch festgehalten und ihr Einfluss auf die Messergebnisse statistisch analysiert werden. Möglicherweise empfiehlt es sich außerdem, nur wenige, einander bedingende Parameter zu analysieren - beispielsweise IL-1 β und MMP-2 (Lalu et al. 2006) - und dafür häufigere Messungen durchzuführen, um so einen Überblick bezüglich durchschnittlicher Konzentrationsverläufe und etwaige Feedback-Mechanismen im Zuge des Kolikgeschehens zu erlangen. Bezogen auf die Matrix-Metalloproteinasen und ihre kollagenolytischen/elastinolytischen Effekte im Extrazellularraum (Lu et al. 2011; Page-McCaw et al. 2007; Gardner und Ghorpade 2003; Brinckerhoff und Matrisian 2002) wären Messungen in einem weit fortgeschrittenen Stadium der Pathoätiologie von Koliken (eventuell sogar erst im post-operativen Management) gegenüber der Quantifizierung während des Akutstadiums zu bevorzugen.

Als Fazit unserer Ergebnisse und der erörterten Diskussionspunkte lässt sich festhalten, dass das Zusammenspiel von Endotoxinen und Entzündungsparametern sowie deren Verknüpfungen mit den Aufgabengebieten der Matrix-Metalloproteinasen und ihren Inhibitoren einer Komplexität unterliegt, die noch ausreichend Forschungsmaterial für medizinische Studien verschiedenster Fachrichtungen liefern wird.

6 Zusammenfassung

Evaluation neuer Biomarker für Endotoxämie und Sepsis bei der Kolik des Pferdes

„Kolik“, als Symptomkomplex für starke Abdominalschmerzen, sind die häufigsten Notfälle in der Pferdemedizin. Treten sie in Form eines strangulierenden Ileus oder einer Enteritis auf, kommt es aufgrund der erhöhten Permeabilität der Darmwände zu einem Übertritt von gramnegativen Bakterien aus dem Gastrointestinaltrakt in die Bauchhöhle und den Körperkreislauf. Die Hypothesen dieses Promotionsvorhabens bestanden in der Annahme, dass die daraus resultierende Endotoxämie eine Ausschüttung und Aktivierung von Entzündungsmediatoren (TNF- α und IL-1 β) sowie Matrix-Metalloproteinasen (MMP-2 und MMP-8) initiiert. Diese proteolytischen Enzyme und ihre Inhibitoren (TIMPs) wurden in dieser Arbeit untersucht, da die Integrität des Gewebes gesunder Pferde maßgeblich von einer Balance aus Degradierung der extrazellulären Matrix mittels MMPs sowie deren Inhibition durch TIMPs abhängt, wobei sich bei pathologischen Geschehen die Relation zugunsten der MMPs und ihrer elastolytischen und kollagenolytischen Aktivität zu verschieben scheint.

Das Patientengut der Studie bestand aus 47 Pferden mit Kolik- Symptomen divergierenden Schweregrades. Mittels eines modifizierten Sepsis-Scores nach Breuer und Schusser wurden die Probanden abhängig von ihrem Allgemeinbefinden, ihren Schleimhäuten, ihrer Herz- und Atemfrequenz, inneren Körpertemperatur und Leukozytenanzahl sowie Konzentration an ionisiertem Kalzium im Blut in Sepsis-positiv, -fraglich oder -negativ eingestuft. Unter Zuhilfenahme von speziesspezifischen Sandwich-ELISA-kits erfolgte anschließend die Messung der MMP-2 und -8, TIMP-1 und -2 sowie TNF- α und IL-1 β Konzentrationen sowohl im Bauchhöhlenpunktat als auch Plasma der Patienten.

Die durchgeführte lineare Diskriminanzanalyse ergab, dass alle Parameter des Sepsis-Scores (außer dem ionisierten Kalzium) der Unterscheidung in die verschiedenen Sepsis-Gruppen zuträglich waren. Allerdings ließ sich keine statistische Korrelation zwischen den Laborbefunden, dem Schweregrad der klinischen Anzeichen, den Sepsis-Gruppen und den Konzentrationen der untersuchten Parameter feststellen.

Weder die Hypothese, dass Koliken bei Pferden zu Endotoxämien führen, welche ihrerseits messbare Erhöhungen der Aktivitäten von Zytokinen im Plasma oder Bauchhöhlenpunktat dieser Tiere bewirken, noch die These der elastinolytischen/kollagenolytischen Dysbalance bei kolikenden Pferden, die sich in der vermehrten Produktion von Matrix-Metalloproteinasen manifestiert, konnte somit bestätigt werden.

Als mögliche Ursachen für die fehlenden Korrelationen kommen sowohl eine zu geringe Sensitivität der verwendeten ELISA-kits als auch ein verbesserungswürdiger Versuchsaufbau

in Frage. Zukünftige Studien könnten sich durch das Auswählen nachweislich septischer Pferde vermehrt auf die Entzündungskaskaden von der Endotoxämie zur Zytokinausschüttung oder auf die Funktion der MMPs bei Umbauprozessen des Extrazellularraumes in Gegenwart von Adhäsionen und Fibrosierungen bei post-operativen Kolikern konzentrieren.

7 Summary

Evaluation of New Biomarkers Associated with Endotoxemia and Sepsis in Equine Colic

Equine colic, as a symptom-complex for severe abdominal pain, is the leading cause of emergency medical treatment within horse medicine. In strangulating obstruction and severe gastrointestinal inflammation, the enhanced permeability of the inflamed intestinal wall causes cell-wall components of gram-negative bacteria to reach the peritoneal cavity and circulation. Purpose of this study was to prove that endotoxemia resulting therefrom stimulates activation and production of inflammatory mediators (TNF- α , IL-1 β) and matrix-metalloproteinases (MMP-2, MMP-8). These proteolytic enzymes and their inhibitors (TIMPs) play an important role in keeping an equilibrium between degradation of extracellular matrix and its inhibition, which made them an object of our research. In certain pathological conditions the elastolytic and collagenolytic activity of the matrix-metalloproteinases seems to predominate the equipoise.

47 horses, that showed clinical signs of colic with various severities, were included in the study. A modified sepsis scoring system published by Breuer and Schusser was used to classify the equids as negative, questionable or positive for sepsis, measuring their general condition, heart and respiratory rate, rectal temperature, mucous membranes, white blood cell count and ionized calcium. MMP-2, MMP-8, TIMP-1, TIMP-2, IL-1 β and TNF- α concentrations were evaluated in plasma and peritoneal fluid using species-specific sandwich ELISA kits. In a linear discriminant analysis, every medical finding of sepsis scoring apart from ionized calcium separated well between sepsis severity groups. Unfortunately, all research objectives studied did not show any differences correlating to the severity of clinical signs, laboratory findings or positive sepsis scoring.

Neither conclusions on an elastolytic or collagenolytic imbalance caused by an increased production of matrix-metalloproteinases can be realistically drawn at this point of time, nor could we demonstrate how equine colic may lead to endotoxemia resulting in measurably enhanced inflammatory mediators` activity. The failure to show any significant differences for the assessments may either be a matter of the ELISAs` low sensitivity or are based upon deficient experimental setup.

Further studies could focus on the inflammatory cascade leading from endotoxemia to cytokine distribution by choosing only septic horses as subjects. Additionally, the diagnostic value of MMPs for postoperative management of equine colic could be explored to gain information on extracellular remodelling within the abdominal cavity favouring adhesion and fibrosis formation.

8 Literaturverzeichnis

Abutarbush S M, Carmalt J L, Shoemaker R W (2005): Causes of gastrointestinal colic in horses in western Canada: 604 cases (1992 to 2002). *Can Vet J*, 2005 Sep, 46(9): 800-805

Ağca B, İşcan A Y, Polat E, Memişoğlu K (2018): The antibacterial effect of peritoneal fluid in experimental peritonitis. *TJTES*, 2018 May, 24(5): 387-390

Andaluz-Ojeda D, Bobillo F, Iglesias V, Almansa R, Rico L, Gandía F, Resino S, Tamayo E, de Lejarazu R O, Bermejo-Martin J S (2012): A combined score of pro- and anti-inflammatory interleukins improves mortality prediction in severe sepsis. *Cytokine*, 2012 Mar, 57(3): 332-6

Andrews F M, Hamlin R L, Stalnaker P S (1990): Blood viscosity in horses with colic. *J Vet Intern Med*, 1990 Jul-Aug, 4(4): 183-6

Arden W A, Stick J A (1988): Serum and peritoneal fluid phosphate concentrations as predictors of major intestinal injury associated with equine colic. *J Am Vet Med Assoc*, 1988 Oct, 193(8): 927-31

Arosalo B M, Raekallio M, Rajamäki M, Holopainen E, Kastevaara T, Salonen H, 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 Vet Scand*, 2007 Jan, 49(1): 4

Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung J C, Moskowitz M A, Fini M E, Lo E H (2001): Effects of Matrix Metalloproteinase-9 Gene Knock-Out on the Proteolysis of Blood-Brain Barrier and White Matter Components after Cerebral Ischemia. *J Neurosci*, 2001 Oct, 21(19): 7724-32

Ayaz M M, Chaudhry A A, Pervaz K, Khan M S, Ashraf M (1997): Blood serum chemistry (sodium, potassium, bicarbonate and chloride) of horses with and without colic. *Pakistan Vet J*, 1997, 17(4): 202

Ayaz M M, Pervaz K, Khan M S, Khan S A, Ashraf M (1999): Clinical and biochemical studies in equine colic. *Pakistan Vet J*, 1999, 19(2): 91-93

Barnes P J (2008): The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*, 2008 Nov, 118(11): 3546-56

Barton A K, Shety T, Bondzio A, Einspanier R, Gehlen H (2015): Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors in Comparison between Different Chronic Pneumopathies in the Horse. *Mediators Inflamm*, 2015 Dec, 2015: 569512

Barton A K, Shety T, Bondzio A, Einspanier R, Gehlen H (2016): Metalloproteinases and their inhibitors are influenced by inhalative glucocorticoid therapy in combination with environmental dust reduction in equine recurrent airway obstruction. *BMC Vet Res*, 2016 Dec, 12(1): 282

Barton A K, Shety T, Klier J, Geis S, Einspanier R, Gehlen H (2019a): Metalloproteinases and their Inhibitors under the Course of Immunostimulation by CPG-ODN and Specific Antigen Inhalation in Equine Asthma. *Mediators Inflamm*, 2019 Jun, 2019: 7845623

Barton A K, Richter I G, Ahrens T, Alawani A, Barnewitz D, Gehlen H (2019b): Is MMP-9 a valuable diagnostic marker of sepsis and endotoxemia in equine colic? *Jahreskongress des ECEIM, Valencia, 22. – 24.11.2019*

Barton A K, 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, 2021: 9501478

Barton M H, Moore J N, Norton N (1997): Effects of pentoxifylline infusion on response of horses to in vivo challenge exposure with endotoxin. *Am J Vet Res*, 1997 Nov, 58(11): 1300-7

Barton M H, Collatos C (1999): TNF and IL-6 Activity and Endotoxin Concentration in Peritoneal Fluid and Blood of Horses with Acute Abdominal Disease. *J Vet Intern Med*, 1999 Sep-Oct, 13(5):457-64

Barton M H, Parviainen A, Norton N (2004): Polymyxin B protects horses against induced endotoxaemia in vivo. *Equine Vet J*, 2004 Jul, 36(5): 397-401

Baskett A, Barton M H, Norton N, Anders B, Moore J N (1997): Effect of pentoxifylline, flunixin meglumine, and their combination on a model of endotoxemia in horses. *Am J Vet Res*, 1997 Nov, 58(11): 1291-9

Bates D W, Parsonnet J, Ketchum P A, Miller E B, Novitsky T J, Sands K, Hibberd P L, Graman P S, Lanken P N, Schwartz J S, Kahn K, Snyderman D R, Moore R, Black E, Platt R (1998):

Limulus amebocyte lysate assay for detection of endotoxin in patients with sepsis syndrome. AMCC Sepsis Project Working Group, Clin Infect Dis, 1998 Sep, 27(3): 582-91

Bauer E A, Stricklin G P, Jeffrey J J, Eisen A Z (1975): Collagenase production by human skin fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun, 1975 May, 64(1): 232-40

Blikslager A T (2006): Clinical Commentary: Peritonitis in the horse. Equine Vet Educ, 2006 Jun, 8(3): 183

Bode W, Fernandez-Catalan C, Grams F, Gomis-Rüth F X, Nagase H, Tschesche H, Maskos K (1999): Insights into MMP-TIMP interactions. Ann N Y Acad Sci, 1999 Jun, 878: 73-91

Bone R C, Balk R A, Cerra F B, Dellinger R P, Fein A M, Knaus W A, Schein R M, Sibbald W J (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, 1992 Jun, 101(6): 1644-55

van den Boom R, Butler C M, van Oldruitenborgh-Oosterbaan S (2010): The usability of peritoneal lactate concentration as a prognostic marker in horses with severe colic admitted to a veterinary teaching hospital. Equine Vet Educ, 2010 Aug, 22(8): 420-425

Breuer J, Schusser G F (2012): Erstellung eines Septikämie-Scores für adulte Pferde. Pferdeheilkunde, 2012 Jul/Aug, (28): 421-428

Brinckerhoff C E, Matrisian L M (2002): Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002 Mar, 3(3): 207-14

Brown G T, Murray G I (2015): Current mechanistic insights into the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. J Pathol, 2015 Nov, 237(3): 273-81

Burke M, Blikslager A (2018): Advances in Diagnostics and Treatments in Horses with Acute Colic and Postoperative Ileus. Vet Clin North Am Equine Pract, 2018 Apr, 34(1): 81-96

Burrows G E (1981): Endotoxemia in the horse. Equine Vet J, 1981 Apr, 13(2): 89-94

Butler G S, Tam E M, Overall C M (2004): The canonical methionine 392 of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) is not required for catalytic efficiency or structural integrity:

probing the role of the methionine-turn in the metzincin metalloprotease superfamily. *J Biol Chem*, 2004 Apr, 279(15): 15615-20

Carrick J B, Begg A P (2008): Peripheral blood leukocytes. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 2008 Aug, 24(2): 239-59

Cavaillon J-M (2015): Molecular Mediators: Cytokines. *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*, 2015 Apr, Vol 1 Issue 1

Cavalleri J M, Bienert-Zeit A, Feige K (2013): Untersuchung des akut kolikkranken Pferdes - labordiagnostische und bildgebende Verfahren [Examination of horses with acute colic - clinical pathology and diagnostic imaging]. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 2013 Apr, 41(2): 124-34

Chen Q, Jin M, Yang F, Zhu J, Xiao Q, Zhang L (2013): Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. *Mediators Inflamm*, 2013 Jun, 2013: 928315

Christophersen M T, Dupont N, Berg-Sørensen K S, Konnerup C, Pihl T H, Andersen P H (2014): Short-term survival and mortality rates in a retrospective study of colic in 1588 Danish horses. *Acta Vet Scand*, 2014 Apr, 56(1): 20

Clegg P D, Coughlan A R, Carter S D (1998): Equine TIMP-1 and TIMP-2: identification, activity and cellular sources. *Equine Vet J*, 1998 Sep, 30(5): 416-23

Cohen N D (1997): Epidemiology of colic. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 1997 Aug, 13(2): 191-201

Conlon G A, Murray G I (2019): Recent advances in understanding the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol*, 2019 Apr, 247(5): 629-640

Cook V L, Hassel D M (2014): Evaluation of the Colic in Horses: Decision for Referral. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 2014 Aug, 30(2): 383-98

Cooperstock M S (1974): Inactivation of endotoxin by polymyxin B. *Antimicrob Agents Chemother*, 1974, 6(4): 422-425

Corry D B, Kiss A, Song L Z, Song L, Xu J, Lee S H, Werb Z, Kheradmand F (2004): Overlapping and independent contributions of MMP2 and MMP9 to lung allergic inflammatory cell egression through decreased CC chemokines. *FASEB J*, 2004 Jun, 18(9): 995-7

da Costa A H C, da Silva Correia G, de Medeiros Assis D, Melo H M, Azevedo Nunes V N, Nóbrega G D, Lira Nunes I M, Sena Lima C D, de Melo Vaz A F (2020): Prognostic measurement for equines with colic. *Comp Clin Pathol*, 2020 Aug, 29: 1083–1086

Cowell R L, Tyler R D, Clinkenbeard K D, MacAllister C G (1987): Collection and evaluation of equine peritoneal and pleural effusions. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 1987 Dec, 3(3): 543-61

Cunha F Q, Ferreira S H (2003): Peripheral hyperalgesic cytokines. *Adv Exp Med Biol*, 2003, 521: 22-39

Davidson A J, Edwards G B, Proudman C J, Cripps P J, Matthews J B (2002): Cytokine mRNA expression pattern in horses with large intestinal disease. *Res Vet Sci*, 2002 Jun, 72(3): 177-85

Decker K (1990): Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem*, 1990 Feb, 192: 245-2611

Delesalle C, Dewulf J, Lefebvre R A, Schuurkes J A, Proot J, Lefere L, Deprez P (2007): Determination of lactate concentrations in blood plasma and peritoneal fluid in horses with colic by an Accusport analyzer. *J Vet Intern Med*, 2007 Mar-Apr, 21(2): 293-301

Dinarelli C A (2007): Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol*, 2007 Nov, 37 Suppl 1 (Suppl 1): S34-45

Donawick W J, Ramberg C F, Paul S R, Hiza M A (1975): The diagnostic and prognostic value of lactate determinations in horses with acute abdominal crisis. *J S Afr Vet Assoc*, 1975 Mar, 46(1): 127

Duesterdieck-Zellmer K, Riehl J, Mckenzie E, Firshman A, Payton M, Gorman M (2014): Effects of abdominocentesis technique on peritoneal fluid and clinical variables in horses. *Equine Vet Educ*, 2014 Feb, 26(5): 262-268

Dukti S, White N A (2009): Prognosticating equine colic. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 2009 Aug, 25(2): 217-31

Ebker T (2017): Die Rolle der Leber im cholinergen antiinflammatorischen Signalweg unter besonderer Betrachtung der Kupffer-Zellen. Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Medizinische Fakultät, Diss.

Egeblad M, Werb Z (2002): New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2002 Mar, 2(3): 161-74

Epstein A, Nir E, Eyngor M, Eldar A, Bdolah-Abram T, Kelmer E, Steinman A, Bruchim Y (2016): Dynamic of Cytokine Gene Transcription (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) in Surgically Treated Colic Horses by Use of Real-Time PCR (RT-PCR). *Isr J Vet Med*, 2016 March, 71: 1

Feary D J, Hassel D M (2006): Enteritis and colitis in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 2006 Aug, 22(2): 437-79

Feige K, Schwarzwald C C, Bombeli T (2003): Comparison of unfractionated and low molecular weight heparin for prophylaxis of coagulopathies in 52 horses with colic: a randomised double-blind clinical trial. *Equine Vet J*, 2003 Jul, 35(5): 506-513

Fietz S, Einspanier R, Hoppner S, Hertsch B, Bondzio A (2008): Determination of MMP-2 and -9 activities in synovial fluid of horses with osteoarthritic and arthritic joint diseases using gelatin zymography and immunocapture activity assays. *Equine Vet J*, 2008 May, 40(3): 266-71

Fischer A T Jr. (1997): Advances in diagnostic techniques for horses with colic. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 1997 Aug, 13(2): 203-19

Fischer A T Jr. (1989): Diagnostic and prognostic procedures for equine colic surgery. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 1989 Aug, 5(2): 335-50

Freudenberg M A, Keppler D, Galanos C (1986): Requirement for lipopolysaccharide-responsive macrophages in galactosamine-induced sensitization to endotoxin. *Infect Immun*, 1986 Mar, 51(3): 891-5

Fugler L A, Eades S C, Moore R M, Koch C E, Keowen M L (2013): Plasma matrix metalloproteinase activity in horses after intravenous infusion of lipopolysaccharide and

treatment with matrix metalloproteinase inhibitors.
Am J Vet Res, 2013 Mar, 74(3): 473-80

Fulton I C, Brown C M, Yamini B (1990): Adenocarcinoma of intestinal origin in a horse: diagnosis by abdominocentesis and laparoscopy. Equine Vet J, 1990 Nov, 22(6): 447-8

Galanos C, Lüderitz O, Rietschel E T, Westphal O, Brade H, Brade L, Freudenberg M, Schade U, Imoto M, Yoshimura H, Kusumoto S, Shiba T (1985): Synthetic and Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities. Eur J Biochem, 1985 Apr, 148(1): 1-5

Gardner J, Ghorpade A (2003): Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1: the TIMPed balance of matrix metalloproteinases in the central nervous system. J Neurosci Res, 2003 Dec, 74(6): 801-6

Gardner R B, Nydam D V, Mohammed H O, Ducharme N G, Divers T J (2005): Serum gamma glutamyl transferase activity in horses with right or left dorsal displacements of the large colon. J Vet Intern Med, 2005 Sep-Oct, 19(5): 761-4

O' Garra A, Viera P (2007): T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. Nat Rev Immunol, 2007 Jun, 7(6): 425-8

Garret L A, Brown R, Poxton I R (2002): A comparative study of the intestinal microbiota of healthy horses and those suffering from equine grass sickness. Vet Microbiol, 2002 Jun, 87(1): 81-8

Genn H J, Hertsch B (1982): Die diagnostische und prognostische Bedeutung des Laktatwertes im Blut sowie in der Bauchhöhlenflüssigkeit bei der Kolik des Pferdes [Diagnostical and prognostical value of blood lactate concentration and its level in peritoneal fluid in colic of the horse]. Dtsch Tierarztl Wochenschr, 1982 Jul, 89(7): 295-9

Gibbs P G, Potter G D, Schelling G T, Kreider J L, Boyd C L (1988): Digestion of hay protein in different segments of the equine digestive tract. J Anim Sci, 1988 Feb, 66(2): 400-6

Gitari A N, Nguhiu-Mwangi J, Mogoia E M, Varma V J, Mwangi W E, Konde A M, Rashid F K (2016): Hematological and Biochemical Changes in Horses with Colic in Nairobi County. Inter J Vet Sci, 2016 Sep, (4): 250-255

Gomez D E, Alonso D F, Yoshiji H, Thorgeirsson U P (1997): Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, 1997 Oct, 74(2): 111-122

Greenlee K J, Corry D B, Engler D A, Matsunami R K, Tessier P, Cook R G, Werb Z, Kheradmand F (2006): Proteomic identification of in vivo substrates for matrix metalloproteinases 2 and 9 reveals a mechanism for resolution of inflammation. *J Immunol*, 2006 Nov, 177(10): 7312-21

Gross J, Lapiere C M (1962): Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1962 Jun, 48(6): 1014–1022

Gulati K, Joshi J, Guhathakurta S, Rai N, Arunabha R (2016): Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. *MOJ Immunol*, 2016 Oct, 4(2): 00121

Halbersztadt A, Haloń A, Pajak J, Robaczyński J, Rabczynski J, St Gabryś M (2006): Rola metaloproteinaz macierzowych w procesie inwazji nowotworowej i przerzutowaniu [The role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis]. *Ginekol Pol*, 2006 Jan, 77(1): 63-71

Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H, Lively J C, Maeshima Y, Yang C, Hynes R O, Werb Z, Sudhakar A, Kalluri R (2003): Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV $\alpha 3$ chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via $\alpha V \beta 3$ integrin. *Cancer Cell*, 2003 Jun, 3(6): 589-601

Haro H, Crawford H C, Fingleton B, MacDougall J R, Shinomiya K, Spengler D M, Matrisian L M (2000): Matrix metalloproteinase-3–dependent generation of a macrophage chemoattractant in a model of herniated disc resorption. *J Clin Invest*, 2000 Jan, 105(2): 133-41

Hassel D M, Hill A E, Rorabeck R A (2009): Association between hyperglycemia and survival in 228 horses with acute gastrointestinal disease. *J Vet Intern Med*, 2009 Nov-Dec, 23(6): 1261-5

Helander I M, Lindner B, Brade H, Altmann K, Lindberg A A, Rietschel E T, Zähringer U (1988): Chemical structure of the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* strain I-69 Rd–/b+. Description of a novel deep-rough chemotype. *Eur J Biochem*, 1988 Nov, 177(3): 483-92

Henderson I S F (2013): Diagnostic and prognostic use of L-lactate measurement in equine practice. *Equine Vet Educ*, 2013 Apr, 25(9): 468-475

Herion J C, Walker R I, Palmer J G (1960): Relation of leukocyte and fever responses to bacterial endotoxin. *Am J Physiol*, 1960 Nov, 199: 809-13

Hillyer M H, Taylor F G, French N P (2001): A cross-sectional study of colic in horses on thoroughbred training premises in the British Isles in 1997. *Equine Vet J*, 2001 Jul, 33(4): 380-5

Hoffmann U, Bertsch T, Dvortsak E, Liebetrau C, Lang S, Liebe V, Huhle G, Borggreffe M, Brueckmann M (2006): Matrix-metalloproteinases and their inhibitors are elevated in severe sepsis: prognostic value of TIMP-1 in severe sepsis. *Scand J Infect Dis*, 2006 Oct; 38(10): 867-72

Holdenrieder S, Stieber P (2019): Tissue inhibitor of metalloproteinase-1. In: Gressner A M, Arndt T (eds) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, Springer Reference Medizin, Berlin, Heidelberg: Springer, ISBN: 978-3-662-48985-7

Hollis A R, Boston R C, Corley K T (2007): Blood glucose in horses with acute abdominal disease. *J Vet Intern Med*, 2007 Sep-Oct, 21(5): 1099-103

Holst O, Ulmer A J, Brade H, Flad H-D, Rietschel E Th (1996): Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunol Med Microbiol* 16, 1996 Dec, 83-104

Holtmann H, Resch K (1995): Cytokines. *Naturwissenschaften*, 1995 Apr, 82(4): 178-87

Ireland J, Clegg P D, McGowan C M, Pinchbeck G L, McKane S A (2011): A cross-sectional study of geriatric horses in the United Kingdom. Part 2: Health care and disease. *Equine Vet J*, 2011 Jan, 43(1): 37-44

Isaacs A, Lindenmann J (1957): Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1957 Sep, 147(927): 258-67

Issaoui L (2012): Equine practitioner participation required for colic survey. *Vet Rec*, 2012 Oct, 171(17): 430

Itoh Y, Nagase H (2002): Matrix metalloproteinases in cancer. *Essays Biochem*, 2002 Oct, 38: 21-36

Johnston K, Holcombe S J, Hauptman J G (2007): Plasma lactate as a predictor of colonic viability and survival after 360 degrees volvulus of the ascending colon in horses. *Vet Surg*, 2007 Aug, 36(6): 563-7

Julius D, Basbaum A I (2001): Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 2001 Sep, 413(6852): 203-10

Juzwiak J S, Ragle C A, Brown C M, Krehbiel J D, Slocombe R F (1991): The effect of repeated abdominocentesis on peritoneal fluid constituents in the horse. *Vet Res Commun*, 1991 May, 15(3): 177-80

Kalsbeek H C (1975): Indications for surgical intervention in equine colic. *J S Afr Vet Assoc*, 1975 Mar, 46(1): 101-5

Kaneene J B, Ross W A, Miller R (1997): The Michigan equine monitoring system. II. Frequencies and impact of selected health problems. *Prev Vet Med*, 1997 Feb, 29(4): 277-92

Kelmer G, Doherty T J, Elliott S, Saxton A, Fry M M, Andrews F M (2008): Evaluation of dimethyl sulphoxide effects on initial response to endotoxin in the horse. *Equine Vet J*, 2008 Jun, 40(4): 358-63

Kilcoyne I, Nieto J E, Dechant J E (2019): Predictive value of plasma and peritoneal creatine kinase in horses with strangulating intestinal lesions. *Vet Surg*, 2019 Feb, 48(2): 152-158

Kilcoyne I, Nieto J E, Dechant J E (2020): Diagnostic value of plasma and peritoneal fluid procalcitonin concentrations in horses with strangulating intestinal lesions. *J Am Vet Med Assoc*, 2020 Apr, 256(8): 927-933

King J N, Gerring E L (1988): Detection of endotoxin in cases of equine colic. *Vet Rec*, 1988, 123: 269-271

Klaus J V (2019): Matrixmetalloproteinasen und Cathepsine in der Kollagenegradierung im abdominalen Aortenaneurysma. Technische Universität München, Fakultät für Medizin, Diss.

Krista K M, White N A, Barrett J G, Furr M O, Buechner-Maxwell V A (2013): Evaluation of neutrophil apoptosis in horses with acute abdominal disease. *Am J Vet Res*, 2013 Jul, 74(7): 999-1004

Krueger C R, Ruple-Czerniak A, Hackett E S (2014): Evaluation of plasma muscle enzyme activity as an indicator of lesion characteristics and prognosis in horses undergoing celiotomy for acute gastrointestinal pain. *BMC Vet Res*, 2014 Jul, 10(1): 7

La Cava A, Sarvetnick N (1999): The role of cytokines in autoimmunity. *Curr Dir Autoimmun*, 1999, 1: 56-71

Lalu M M, Cena J, Chowdhury R, Lam A, Schulz R (2006): Matrix metalloproteinases contribute to endotoxin and interleukin-1beta induced vascular dysfunction. *Br J Pharmacol*, 2006 Sep, 149(1): 31-42

Lalu M M, Csont T, Schulz R (2004): Matrix metalloproteinase activities are altered in the heart and plasma during endotoxemia. *Crit Care Med*, 2004 Jun, 32(6): 1332-7

Lanone S, Zheng T, Zhu Z, Liu W, Lee C G, Ma B, Chen Q, Homer R J, Wang J, Rabach L A, Rabach M E, Shipley J M, Shapiro S D, Senior R M, Elias J A (2002): Overlapping and enzyme-specific contributions of matrix metalloproteinases-9 and -12 in IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Clin Invest*, 2002 Aug, 110(4): 463-74

Latson K M, Nieto J E, Beldomenico P M, Snyder J R (2005): Evaluation of peritoneal fluid lactate as a marker of intestinal ischaemia in equine colic. *Equine Vet J*, 2005 Jul, 37(4): 342-

Lee M M, Yoon B J, Osiewicz K, Preston M, Bundy B, van Heeckeren A M, Werb Z, Soloway P D (2005): Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 regulates resistance to infection. *Infect Immun*, 2005 Jan, 73(1): 661-5

Lee S, Jilani S M, Nikolova G V, Carpizo D, Iruela-Arispe M L (2005): Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol*, 2005 May, 169(4): 681-91

Lelongt B, Bengatta S, Delauche M, Lund L R, Werb Z, Ronco P M (2001): Matrix metalloproteinase 9 protects mice from anti-glomerular basement membrane nephritis through its fibrinolytic activity. *J Exp Med*, 2001 Apr, 193(7): 793-802

Ley K, Laudanna C, Cybulsky M I, Nourshargh S (2007): Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 2007 Sep, 7(9): 678-89

Liappis N, Jäkel A (1978): Über die refraktometrische Bestimmung der Gesamteiweiß-Konzentration im Serum, Vergleich Refraktometrie-/Biuret-Methode [Refractometric measurement of total serum protein, comparison of refractometry and biuret test (author's transl)]. *Klin Padiatr*, 1978 Jul, 190(4): 389-96

Lijnen H R (2001): Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost*, 2001 Jul, 86(1): 324-33

Lindsay G K, Roslansky P F, Novitsky T J (1989): Single-step, chromogenic *Limulus* amoebocyte lysate assay for endotoxin. *J Clin Microbiol*, 1989 May, 27(5): 947-51

Lischka B (1987): Antiendotoxische Immuntherapie. *Pferdeheilkunde*, 1987 Sep, 3(1r82): 243-249

Loftus J P, Johnson P J, Belknap J K, Pettigrew A, Black S J (2009): Leukocyte-derived and endogenous matrix metalloproteinases in the lamellae of horses with naturally acquired and experimentally induced laminitis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009 Jun, 129(3-4): 221-30

Lu P, Takai K, Weaver V M, Werb Z (2011): Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011 Dec, 3(12): a005058

MacKay R J, King R R, Dankert J R, Reis K J, Skelley L A (1991): Cytotoxic tumor necrosis factor activity produced by equine alveolar macrophages: Preliminary characterization. *Vet Immunol Immunopathol*, 1991 Aug, 29(1-2): 15-30

MacKay R J, Merritt A M, Zertuche J M, Whittington M, Skelley L A (1991): Tumor necrosis factor activity in the circulation of horses given endotoxin. *Am J Vet Res*, 1991 Apr, 52(4): 533-8

Martinen P H, Raulo S M, Suominen M M, Tulamo R M (2006): Changes in MMP-2 and -9 activity and MMP-8 reactivity after amphotericin B induced synovitis and treatment with bufexamac. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 2006 Aug, 53(6): 311-8

Matsumoto H, Ogura H, Shimizu K, Ikeda M, Hirose T, Matsuura H, Kang S, Takahashi K, Tanaka T, Shimazu T (2018): The clinical importance of a cytokine network in the acute phase of sepsis. *Sci Rep*, 2018 Sep, 8(1): 13995

Matthews S, Dart A J, Reid S W, Dowling B A, Hodgson D R (2002): Predictive values, sensitivity and specificity of abdominal fluid variables in determining the need for surgery in horses with an acute abdominal crisis. *Aust Vet J*, 2002 Mar, 80(3): 132-6

McQuibban G A, Gong J H, Tam E M, McCulloch C A, Clark-Lewis I, Overall C M (2000): Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science*, 2000 Aug, 289(5482): 1202-6

McQuibban G A, Butler G S, Gong J H, Bendall L, Power C, Clark-Lewis I, Overall C M (2001): Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem*, 2001 Nov, 276(47): 43503-8

Meyers K, Reed S, Keck M, Clem M, Bayly W (1982): Circulating endotoxin-like substances and altered hemostasis in horses with gastrointestinal disorders: An interim report. *Am J Vet Res*, 1982 Dec, 43(12): 2233-8

Michel J, Bercovici B, Sacks T (1980): Comparative studies on the antimicrobial activity of peritoneal and ascitic fluids in human beings. *Surg Gynecol Obstet*, 1980 Jul, 151(1): 55-57

Milne E (2004): Peritoneal fluid analysis for the differentiation of medical and surgical colic in horses. *In Pract*, 2004 Sep, 26(8): 444

Mohammed F F, Smookler D S, Taylor S E, Fingleton B, Kassiri Z, Sanchez O H, English J L, Matrisian L M, Au B, Yeh W C, Khokha R (2004): Abnormal TNF activity in Timp3^{-/-} mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration. *Nat Genet*, 2004 Sep, 36(9): 969-77

Mohanam S, Rao J S (1999): Expression and biological significance of tissue inhibitors of metalloproteinases. *Proc Indian Acad Sci (Chem Sci)*, 1999 Feb, 111 (3): 255–262

Moore J N, Owen R R, Lumsden J H (1976): Clinical evaluation of blood lactate levels in equine colic. *Equine Vet J*, 1976 Apr, 8(2): 49-54

Moore J N, Morris D D (1992): Endotoxemia and septicemia in horses: experimental and clinical correlates. *J Am Vet Med Assoc*, 1992 Jun, 200(12): 1903-14

Moore B E, Dehority B A (1993): Effects of diet and hindgut defaunation on diet digestibility and microbial concentrations in the cecum and colon of the horse. *J Anim Sci*, 1993 Dec, 71(12): 3350-8

Mora R, Binanti D, Mora N, Fantinato E, Ferrante V, Pedrotti L, Riccaboni P (2015): Pathological Findings and Immunohistochemical Evaluation of MMP-2 and TIMPs in Equine Fetlock Affected by Degenerative Joint Disease, *Am J Clin Exp Med*, 2015 July, 3(4): 172-177

Morris D D, Moore J N, Fischer K, Tarleton R L (1990a): Endotoxin-induced tumor necrosis factor activity production by equine peritoneal macrophages. *Circ Shock*, 1990 Mar, 30(3): 229-36

Morris D D, Crowe N, Moore J N (1990b): Correlation of clinical and laboratory data with serum tumor necrosis factor activity in horses with experimentally induced endotoxemia. *Am J Vet Res*, 1990 Dec, 51(12): 1935-40

Morris D D (1991): Endotoxemia in horses. A review of cellular and humoral mediators involved in its pathogenesis. *J Vet Intern Med*, 1991 May-Jun, 5(3): 167-81

Morris D, Moore J, Crowe N, Moldawer L L (1992): Effect of experimentally induced endotoxemia on serum interleukin-6 activity in horses. *Am J Vet Res*, 1992 May, 53(5): 753-6

Morton A J, 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*, 2002 Jul, 34(5): 450-4

Mosmann T R, und Coffman R L (1989): TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 1989, 7: 145-73

Mosseri S, Hetzel U, Hahn S, Michaloupoulou E, Sallabank H C, Knottenbelt D C, Kipar A (2014): Equine sarcoid: In situ demonstration of matrix metalloproteinase expression. *Vet J*, 2014 Nov, 202(2): 279-85

Müller J -M V, Wehrli-Eser M, Waldmeier P, Rohn K, Feige K (2009): Kurz- und Langzeitprognose von Dünndarmkolikern nach Kolikoperation – Dünndarmresektionen haben

keinen nachteiligen Einfluss auf die Überlebensrate erstmals operierter Pferde mit Dünndarmkolik. Tierärztl Prax, 2009; 37(G): 247–254

Myazawa K, Shinozaki M, Furuya T, Miyazono K (2002): Two major Smad pathways in TGF- β superfamily signalling. Genes Cells, 2002 Dec, 7(12): 1191-204

Nagase H, Woessner J F (1999): Matrix metalloproteinases. J Biol Chem, 1999 Jul, 274(31): 21491–21494

Nagase H, Visse R, Murphy G (2006): Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. J Cardio Res, 2006 Feb, 69(3): 562–573

Nappert G, Johnson P J (2001): Determination of the acid-base status in 50 horses admitted with colic between December 1998 and May 1999. Can Vet J, 2001 Sep, 42(9): 703-7

Naruishi K, Nagata T (2018): Biological effects of interleukin-6 on Gingival Fibroblasts: Cytokine regulation in periodontitis. J Cell Physiol, 2018 Sep, 233(9): 6393-6400

Navarro M, Monreal L, Segura D, Armengou L, Añor S A (2005): Comparison of traditional and quantitative analysis of acid-base and electrolyte imbalances in horses with gastrointestinal disorders. J Vet Intern Med, 2005 Nov-Dec, 19(6): 871-7

Nelson A W (1979): Analysis of equine peritoneal fluid. Vet Clin North Am Large Anim Pract, 1979 Nov, 1(2): 267-74

Newby A C (2016): Metalloproteinase production from macrophages - a perfect storm leading to atherosclerotic plaque rupture and myocardial infarction. Exp Physiol, 2016 Nov, 101(11): 1327-1337

Norberg B, Warvenius S (1952): A hematocrit centrifuge. Scand J Clin Lab Invest, 1952 May, 4(3): 249-50

Obata T, Nomura M, Kase Y, Sasaki H, Shirasawa Y (2008): Early detection of the Limulus amebocyte lysate reaction evoked by endotoxins. Anal Biochem, 2008 Feb, 373(2): 281-6

Oddsdóttir C, Riley S C, Leask R, Shaw D J, Aurich C, Palm F, Fowden A L, Ricketts S W, Watson E D (2011): Dynamics of activities of matrix metalloproteinases-9 and -2, and the

tissue inhibitors of MMPs in fetal fluid compartments during gestation and at parturition in the mare. *Theriogenology*. 2011 Apr, 75(6): 1130-8

Okada A, Bellocq J P, Rouyer N, Chenard M P, Rio M C, Chambon P, Basset P (1995): Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995 Mar, 92(7): 2730-4

Opdenakker G, Van Damme J (1994): Cytokine-regulated proteases in autoimmune diseases. *Immunol Today*, 1994 Mar, 15(3): 103–107

Opdenakker G, Fibbe W E, Van Damme J (1998): The molecular basis of leukocytosis. *Immunol Today*, 1998 Apr, 19(4): 182–189

Opdenakker G, Van den Steen P E, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, Proost P, Van Damme J (2001): Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol*, 2001 Jun, 69(6): 851-9

Osman B, Akool el-S, Doller A, Müller R, Pfeilschifter J, Eberhardt W (2011): Differential modulation of the cytokine-induced MMP-9/TIMP-1 protease-antiprotease system by the mTOR inhibitor rapamycin. *Biochem Pharmacol*, 2011 Jan, 81(1): 134-43

Ozaki K, Leonard W J (2002): Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J Biol Chem*, 2002 Aug, 277(33): 29355-8

Page-McCaw A, Ewald A J, Werb Z (2007): Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007 Mar, 8(3): 221-33

Pagenstecher A, Stalder A K, Kincaid C L, Shapiro S D, Campbell I L (1998): Differential expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase genes in the mouse central nervous system in normal and inflammatory states. *Am J Pathol*, 1998 Mar, 152(3): 729-41

Paim K, e Silva MLA, Alonso J, Rodrigues C A, Hussni C A, Watanabe M J (2019): Lactataemia and glycaemia in equine colic syndrome: review. *PUBVET*, 2019 Sep, 13(8): 1-9

Parry B W, Anderson G A, Gay C C (1983): Prognosis in equine colic: a comparative study of variables used to assess individual cases. *Equine Vet J*, 1983 Jul, 15(3): 211-5

- Peloso J G, Cohen N D (2012): Use of serial measurements of peritoneal fluid lactate concentration to identify strangulating intestinal lesions in referred horses with signs of colic. *J Am Vet Med Assoc*, 2012 May, 240(10): 1208-17
- Peñaililloa A K, Sepulveda M A, Palma C J, Espinoza A, Aguilera M, Burgos RA, Carretero D, Islas A, Pérez R (2016): Haematological and blood biochemical changes induced by the administration of low doses of *Escherichia coli* lipopolysaccharide in rabbits. *Arch med vet*, 2016 Jan, 48(3): 315-320
- Piperigkou Z, Kyriakopoulou K, Koutsakis C, Mastronikolis S, Karamanos NK (2021): Key Matrix Remodeling Enzymes: Functions and Targeting in Cancer. *Cancers (Basel)*, 2021 Mar, 13(6): 1441
- Planck S R, Becker M D, Crespo S, Choi D, Galster K, Garman K L, Nobiling R, Rosenbaum J T (2008): Characterizing extravascular neutrophil migration in vivo in the iris. *Inflammation*, 2008 Apr, 31(2): 105-11
- Pfeiffer R (1892): Untersuchungen über das Cholera Gift. *Zeitschr. f. Hygiene*. 11, 1892 Dez, 393–412
- Proudman C J (1992): A two year, prospective survey of equine colic in general practice. *Equine Vet J*, 1992 Mar, 24(2): 90-3
- Proudman C J, Edwards G B, Barnes J, French N R (2005): Factors affecting long-term survival of horses recovering from surgery of the small intestine. *Equine Vet J*, 2005 Jul, 37(4): 360-5
- Pugin J, Widmer M C, Kossodo S, Liang C M, Preas H L 2nd, 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*, 1999 Mar, 20(3): 458-64
- Pusterla N, Magdesian K G, Mapes S, Leutenegger C M (2006a): Expression of molecular markers in blood of neonatal foals with sepsis. *Am J Vet Res*, 2006 Jun, 67(6): 1045-9
- Pusterla N, Wilson W D, Conrad P A, Barr B C, Ferraro G L, Daft B M, Leutenegger C M (2006b): Cytokine gene signatures in neural tissue of horses with equine protozoal myeloencephalitis or equine herpes type 1 myeloencephalopathy. *Vet Rec*, 2006 Oct, 159(11): 341-6

Pyo R, Lee J K, Shipley J M, Curci J A, Mao D, Ziporin S J, Ennis T L, Shapiro S D, Senior R M, Thompson R W (2000): Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest*, 2000 Jun, 105(11): 1641-9

Raetz C R H (1990): Biochemistry of Endotoxins. *Annu Rev Biochem*, 1990, 59: 129-70

Rani P, Singh R, Singh S, Bansal B (2018): A Study on Clinico-Biochemical Evaluation in Equine Colic Patients. *J Anim Res*, 2018 Feb, 8(1): 93-99

Rapacz-Leonard A, Kankofer M, Leonard M, Wawrzykowski J, Dąbrowska M, Raś A, Paździor-Czapula K, Janowski T (2015): Differences in extracellular matrix remodeling in the placenta of mares that retain fetal membranes and mares that deliver fetal membranes physiologically. *Placenta*. 2015 Oct, 36(10): 1167-77

de la Rebière de Pouyade G, Grulke S, Detilleux J, Salciccia A, Verwilghen D R, Caudron I, Gangl M, Serteyn D D (2009): Evaluation of low-molecular-weight heparin for the prevention of equine laminitis after colic surgery. *J Vet Emerg Crit Care*, 2009 Feb, 19(1): 113-9

Reeves M J, Curtis C R, Salman M D, Hilbert B J (1989): Prognosis in equine colic patients using multivariable analysis. *Can J Vet Res*, 1989 Jan, 53(1): 87-94

Richardson J A, Borchardt K (1972): Antibacterial effect of different dialysates. *Br Med J*, 1972 May, 2(5811): 468 - 469

Rieger M, Kochleus C, Teschner D, Rascher D, Barton A K, Geerlof A, Kremmer E, Schmid M, Hartmann A, Gehlen H (2014): A new ELISA for the quantification of equine procalcitonin in plasma as potential inflammation biomarker in horses. *Anal Bioanal Chem*, 2014 Sep, 406(22): 5507-12

Rietschel E T, Brade H, Brade L, Kaca W, Kawahara K, Lindner B, Lüderitz T, Tomita T, Schade U, Seydel U (1985): Newer aspects of the chemical structure and biological activity of bacterial endotoxins. *Prog Clin Biol Res*, 1985 Jan, 189: 31-51

Rietschel E T, Brade H (1992): Bacterial Endotoxins. *SciAm*, 1992, 267(2): 54-61

Rittner H L, Stein C (2005): Involvement of cytokines, chemokines and adhesion molecules in opioid analgesia. *Eur J Pain*, 2005 Apr, 9(2): 109-12

Romagnani S, Del Prete G, Manetti R, Ravina A, Annunziato F, De Carli M, Mazzetti M, Piccinni M-P, D'Elios M M, Parronchi P, Sampognaro S, Maggi E (1994): Role of TH1/TH2 Cytokines in HIV Infection. *Immunol Rev*, 1994 Aug, 140: 73-92

Rose RJ (1981): A physiological approach to fluid and electrolyte therapy in the horse. *Equine Vet J*, 1981 Jan, 13(1): 7-14

Roy M F (2004): Sepsis in adults and foals. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 2004 Apr, 20(1): 41-61

Roy M F, Kwong G P, 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*, 2017 Mar, 31(2): 582-592

Salciccia A, Sandersen C, Grulke S, de la Rebière de Pouyade G, Caudron I, Serteyn D, Detilleux J (2013): Sensitivity and specificity of blood leukocyte counts as an indicator of mortality in horses after colic surgery. *Vet Rec*, 2013 Sep, 173(11): 267

Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M (1994): A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature*, 1994 Jul, 370(6484): 61-5

Saulez M N, Cebra C K, 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*, 2004 Jul-Aug, 18(4): 564-7

Schletter J, Heine H, Ulmer A J, Rietschel E T (1995): Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbiol*, 1995 Dec, 164(6): 383-9

Schramme M (1995): Investigation and management of recurrent colic in the horse. *In Pract*, 1995 Jul, 17(7): 303-314

Schuhmacher S (2011): Die Rolle des MMP-3 bei experimenteller zerebraler Ischämie und Reperfusion im Tiermodell. Ludwig-Maximilians-Universität zu München, Medizinische Fakultät, Diss.

Seahorn T L, Gaunt S D, Berry C (1994): Blood cell deformability in horses with intestinal colic. *Am J Vet Res*, 1994 Mar, 55(3): 321-4

Semrad S D, Moore J N (1987): Effects of multiple low doses of flunixin meglumine on repeated endotoxin challenge in the horse. *Prostaglandins Leukot Med*, 1987 May, 27(2-3): 169-81

Sessions D R, Vick M M, 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*, 2009 Dec, 87(12): 3955-66

Shear L, Swartz C, Shinaberger J A, Barry K G (1965): Kinetics of peritoneal fluid absorption in adult man. *N Engl J Med*, 1965 Jan, 272: 123-7

Sheats M K (2019): A Comparative Review of Equine SIRS, Sepsis, and Neutrophils. *Front Vet Sci*, 2019 Mar, 6:69

Silverman M H, Ostro M J (1999): Basic Biology of Endotoxin. In: *Bacterial Endotoxin in Human Disease*. S. 2-4, Princeton, NJ: KPMG

Sivula M, Hästbacka J, Kuitunen A, Lassila R, Tervahartiala T, Sorsa T, Pettilä V (2015): Systemic matrix metalloproteinase-8 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in severe sepsis-associated coagulopathy. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2015 Feb, 59(2): 176-84

Sławuta P, Noszczyk-Nowak A, Nowakowski H (2010): Acid-base balance parameters and a value of anion gap of arterial and venous blood in Małopolski horses. *Pol J Vet Sci*, 2010 Dec, 13(4): 581-5

Smuts C, Mills J, Myles R, Gaál T (2016): Lactate Dehydrogenase Activity in Abdominal Fluid From Horses With Colic. *J Equine Vet Sci*, 2016 Jan, (36): 58-62

Southwood L L, Walton R M (2012): Clinical Laboratory Data. In: *Practical Guide to Equine Colic/Hrsg.*: Southwood L L, 1. Auflage, S. 78-87, New Jersey: Wiley-Blackwell - ISBN: 978-0-813-81832-0

Staempfli H R, Townsend H G, Prescott J F (1991): Prognostic features and clinical presentation of acute idiopathic enterocolitis in horses. *Can Vet J*. 1991 Apr, 32(4): 232-7

Steel C M, Gibson K T (2001): Colic in the pregnant and periparturient mare. *Equine Vet Educ*, 2001 Feb, 13(2): 94-104

Stein C (2003): Opioid receptors on peripheral sensory neurons. *Adv Exp Med Biol*, 2003, 521: 69-76

Stein C, Hassan A H, Przewlocki R, Gramsch C, Peter K, Herz A (1990): Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990 Aug, 87(15): 5935-9

Stephens D B (1985): Effects of water availability on plasma protein and sodium concentration, haematocrit and plasma osmolality in the pig. *Q J Exp Physiol*, 1985 Jul, 70(3): 389-401

Sternlicht M D, Werb Z (2001): How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001 Dec, 17: 463-516

Stetler-Stevenson W G, Kruttsch H C, Liotta L A (1989): Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem*, 1989 Oct, 264(29): 17374-8

Strazielle N, Khuth S T, Murat A, Chalon A, Giraudon P, Belin M F, Ghersi-Egea J F (2003): Pro-inflammatory cytokines modulate matrix metalloproteinase secretion and organic anion transport at the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2003 Dec, 62(12): 1254-64

Suffredini A F, Fromm R E, Parker M M, Brenner M, Kovacs J A, Wesley R A, Parrillo J E (1989): The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med*, 1989 Aug, 321(5): 280-7

Sun Y, Huang Z Y, Wang Z H, Li C P, Meng X L, Zhang Y J, Su F, Ma N (2015): TGF- β 1 and TIMP-4 regulate atrial fibrosis in atrial fibrillation secondary to rheumatic heart disease. *Mol Cell Biochem*. 2015 Aug, 406(1-2): 131-8

Swanwick R A, Wilkinson J S (1976): A clinical evaluation of abdominal paracentesis in the horse. *Aust Vet J*, 1976 Mar, 52(3): 109-17

Sykes B W, Furr M O (2005): Equine endotoxaemia: a state of the art review of therapy. *Aust Vet J*, 2005 Jan-Feb, 83(1-2): 45-50

Szóstek-Mioduchowska A, Słowińska M, Pacewicz J, Skarzynski D J, Okuda K (2020): Matrix metalloproteinase expression and modulation by transforming growth factor- β 1 in equine endometrosis. *Sci Rep*, 2020 Jan, 10(1): 1119

Tadros E M, Frank N (2012): Effects of continuous or intermittent lipopolysaccharide administration for 48 hours on the systemic inflammatory response in horses. *Am J Vet Res*, 2012 Sep, 73(9): 1394-402

Tayebjee M H, Lip G Y H (2007): Matrix metalloproteinases and the extracellular matrix. In: *Comprehensive Hypertension/Hrsg.: Gregory Y H L, Hall J E, Philadelphia, Pa, USA: Mosby, Elsevier - ISBN: 978-0-323-03961-1*

Tendler DA (2003): Acute intestinal ischemia and infarction. *Semin Gastrointest Dis*, 2003 Apr, 14(2): 66-76

Tennent-Brown B S (2011): Lactate production and measurement in critically ill horses. *Compend Contin Educ Vet*, 2011 Dec, 33(12): E5

Tennent-Brown B S (2012): Interpreting lactate measurement in critically ill horses: diagnosis, treatment, and prognosis. *Compend Contin Educ Vet*. 2012 Jan, 34(1): E2

Teschner D, Rieger M, Koopmann C, Gehlen H (2015): Procalcitonin in horses with an acute colic. *Pferdeheilkunde*, 2015 Jul, 31(4): 371-377

Tinker M K (1995): A Farm-based Prospective Study for Equine Colic Risk Factors and Risk Associated Events. Virginia Polytechnic Institute and State University, Veterinary Medical Sciences, Diss.

Tinker M K, White N A, Lessard P, Thatcher C D, Pelzer K D, Davis B, Carmel D K (1997a): Prospective study of equine colic incidence and mortality. *Equine Vet J*, 1997 Nov, 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*, 1997 Nov, 29(6): 454-58

Traub-Dargatz J L, Koprál C A, Hillberg Seitzinger A, Garber L P, Forde K, 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 A, 2001 Aug, 219(1): 67-71

Van Hoogmoed L, Rodger L D, Spier S J, Gardner I A, Yarbrough T B, Snyder J R (1999): Evaluation of peritoneal fluid pH, glucose concentration, and lactate dehydrogenase activity for detection of septic peritonitis in horses. J Am Vet Med Assoc, 1999 Apr, 214(7): 1032-6

Verstappen J, Von den Hoff J W (2006): Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. J Dent Res, 2006 Dec, 85(12): 1074-84

Wang M, Qin X, Mudgett J S, Ferguson T A, Senior R M, Welgus H G (1999): Matrix metalloproteinase deficiencies affect contact hypersensitivity: Stromelysin-1 deficiency prevents the response and gelatinase B deficiency prolongs the response. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999 Jun, 96(12): 6885-9

Wang T, He C (2018): Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis. Cytokine Growth Factor Rev, 2018 Dec, 44: 38-50

Weiss D J, Evanson O A (2003): Evaluation of activated neutrophils in the blood of horses with colic. Am J Vet Res, 2003 Nov, 64(11): 1364-8

Weiss DJ, Evanson OA (2002): Evaluation of lipopolysaccharide-induced activation of equine neutrophils. Am J Vet Res, 2002 Jun, 63(6): 811-5

Werners A H, Bull S, Fink-Gremmels J (2005): Endotoxaemia: a review with implications for the horse. Equine Vet J, 2005 Jul, 37(4): 371-83

Wilson C J, Finch C E, Cohen H J (2002): Cytokines and cognition - the case for a head-to-toe inflammatory paradigm. J Am Geriatr Soc, 2002 Dec, 50(12): 2041-56

Woolley D E, Roberts D R, Evanson J M (1975): Inhibition of human collagenase activity by a small molecular weight serum protein. Biochem Biophys Res Commun, 1975 Sep, 66(2): 747-54

Wright S D (1991): Multiple receptors for endotoxin. Curr Opin Immunol, 1991 Feb, 3(1): 83-90

Xie B, Dong Z, Fidler I J (1994): Regulatory mechanisms for the expression of type IV collagenases/gelatinases in murine macrophages. *J Immunol*, 1994 Apr, 152(7): 3637-44

Yuan Z, Gobeil P A, Campo M S, Nasir L (2010): Equine sarcoid fibroblasts over-express matrix metalloproteinases and are invasive. *Virology*, 2010 Jan, 396(1): 143-51

Yamout S Z, Nieto J E, Beldomenico P M, Dechant J E, leJeune S, Snyder J R (2011): Peritoneal and plasma D-lactate concentrations in horses with colic. *Vet Surg*, 2011 Oct, 40(7): 817-24

Yan C, Boyd D D (2007): Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol*, 2007 Apr, 211(1): 19-26

Zídek Z, Anzenbacher P, Kmoníčková E (2009): Current status challenges of cytokines pharmacology. *Br J Pharmacol*, 2009 Jun, 157(3): 342–361

9 Anhang

Tab. 8 Allgemeine Daten, Therapie und Diagnose 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 | V.a. 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 |

Tab. 9 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 |

Tab. 10 Ergebnisse der makroskopischen Untersuchungen und der Laboranalysen der gewonnenen Bauchhöhlenpunkate

| Name | Menge (in ml) | Farbe | Klarheit | TP (g/dl) | Laktat (mmol/l) | Zellgehalt (10³/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 | bläss-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 | bläss-gelb | klar | 0,2 | <1 | 1,26 |
| Petite Fleur | 3,1 | bläss-gelb | klar | 1 | <1 | 1,14 |
| Santoval | 5,0 | gelb-rötlich | mgr. trüb | 2 | 4,6 | 0,81 |
| Deep Red Devil | 7,2 | bläss-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 | bläss-gelb | klar | 1 | <1 | 1,43 |
| Morla | 3,1 | bläss-gelb | klar | 1,6 | 4,8 | 0,16 |
| Morelka | 4,0 | bläss-gelb | klar | 2,4 | k.A. | 1,96 |
| Douwina | 10,0 | bläss-gelb | klar | 0,7 | 1,8 | 0,92 |
| Baden Baden | 3,1 | bläss-gelb | klar | 1,2 | 1,7 | 0,5 |
| Sourire | 5,0 | bläss-gelb | klar | 1 | 2,4 | 0,29 |
| Le Niro | 3,2 | bläss-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 | bläss-gelb | klar | 0,8 | 1 | 0,61 |
| Cocolina | 8,9 | bläss-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 |

Tab. 11 Ergebnisse der Laboranalysen der gewonnenen Blutproben

| Name | HKT (%) | Leukozyten (10³/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 |

Fußnoten

^a ELISA Kit for Matrix Metalloproteinase 2 (MMP-2), Cloud Clone Corp., 23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA

^b ELISA Kit for Matrix Metalloproteinase 8 (MMP-8), Genorise Scientific Inc., PO Box 70 Glen Mills, PA 19342 USA

^c ELISA Kit for Tissue Inhibitors of Metalloproteinase 1 (TIMP-1), Cloud Clone Corp., 23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA

^d ELISA Kit for Tissue Inhibitors of Metalloproteinase 2 (TIMP-2), Cloud Clone Corp., 23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA

^e ELISA Kit for Interleukin 1 beta (IL-1 β), Cloud Clone Corp., 23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA

^f ELISA Kit for Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α), Cloud Clone Corp., 23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA

^g ELISA microplate reader, Tecan Group Ltd., Seestrasse 103, 8708 Männedorf, Switzerland

Finanzierungsquellen

Diese Studie wurde von der Gesellschaft für Pferdemedizin (GPM) finanziert.

Interessenskonflikte

Trotz der finanziellen Unterstützung durch die GPM besteht kein Interessenskonflikt.

Datenverfügbarkeit

https://www.fu-berlin.de/sites/open_access/refubium/index.html

10 Publikationsverzeichnis

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

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

11 Danksagung

Zunächst möchte ich meiner Doktormutter 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.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei meinen weiteren Gutachtern, Frau Prof. Dr. Bahramsoltani und Herr Prof. Dr. Klopffleisch, bedanken, welche mir beide nach erfolgter Bitte ihre sofortigen Zusagen für eine Zweit- beziehungsweise Drittkorrektur erteilt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Oberärztin Frau Dr. Ann-Kristin Barton, deren Bürotür für mich und meine zahlreichen Fragen jederzeit offenstand und die mir während meiner Zeit in der Klinik eine stetige Stütze und Inspiration war.

Natürlich danke ich auch meinen übrigen Kollegen der Pferdeklinik der FU Berlin, vor allem aus der Abteilung für Innere Medizin: Sabita, Karolina, Philip und Dusty. Vielen herzlichen Dank für eure praktische und mentale Unterstützung während meiner Zeit bei euch Internisten.

Fast zum Schluss danke ich selbstverständlich auch den ganz besonderen Menschen in meinem Privatleben, die mich immer ertragen, ausgleichen, unterstützen, zum Lachen bringen, inspirieren, herausfordern oder auffangen: Anja, Jens, Marc, den Kindern, Max, Elisa, Flo und Katrin.

Mein größter Dank allerdings geht in Erinnerung an meine Eltern.

An meinen Vater, der unerschütterlich daran glaubte, dass es auf dieser Erde nichts gibt, was ich nicht erreichen könnte und an meine Mutter, der völlig egal war, was ich erreiche, solange ich glücklich bin. Dank euch besitze ich bereits alles, was ich je brauchen werde: Wurzeln und Flügel!

12 Selbstständigkeitserklärung

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

Berlin, den 02.05.2022

Svenja Lilge



9 783967 291643
mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-164-3