

Stress- und Schmerzparameter bei Kolikpatienten

von Nina Alexandra Gruber

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Stress- und Schmerzparameter bei Kolikpatienten

von Nina Alexandra Gruber

aus Neu-Ulm

München 2024

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Pferdemedizin

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Prof. Dr. Anna May

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Anna May

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Astrid C. C. Wehner-Fleischberger

Tag der Promotion: 6. Juli 2024

Für meine Lieben

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Kolik	3
1.1.	Definition Kolik	3
1.2.	Ursachen und Risikofaktoren für Kolik	4
1.3.	Untersuchungsgang Kolik	7
1.4.	Kolikformen	10
1.5.	Prognoseparameter bei Kolik	17
2.	Schmerz	20
2.1.	Definition Schmerz	20
2.2.	Physiologie der Nozizeption	21
2.3.	Methoden zur objektiven Schmerzeinschätzung	24
3.	In dieser Studie untersuchte Stress- und Schmerzparameter	30
3.1.	Cortisol	30
3.2.	Substanz P	35
3.3.	Alpha-Amylase	44
III.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	47
1.	Zielsetzung	47
2.	Stress- und Schmerzparameter	47
2.1.	Substanz P	47
2.2.	Alpha-Amylase	51
3.	Publikation	53
IV.	ERWEITERTE DISKUSSION	61
V.	ZUSAMMENFASSUNG	73
VI.	SUMMARY	75
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	77
VIII.	DANKSAGUNG	121

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	Alpha-Amylase
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ASS	Acetylsalicylsäure
CPS	Composite Pain Scale
EAAPS	Equine Acute Abominal Pain Scale
EAAPS-1	Equine Acute Abdominal Pain Scale-1
EAAPS-2	Equine Acute Abdominal Pain Scale-2
EGGD	Equine Glandular Gastric Disease
EGUS	Equine Gastric Ulcer Syndrome
EIA	Immunadsorptionstest
EQUUS-COMPASS	Equine Utrecht University Scale for Composite Pain Assessment
EQUUS-FAP	Equine Utrecht University Scale for Facial Assessment of Pain
ESGD	Equine Squamous Gastric Disease
HGS	Horse Grimace Scale
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
IKR	Interkostalraum
MESOR	Midline Estimating Statistics of Rhythm
NK1-Rezeptor	Neurokinin-1-Rezeptor
NKA	Neuropeptid A
NKB	Neuropeptid B
PASPAS	Post Abdominal Surgery Pain Assessment Scale
PNS	Peripheres Nervensystem
RIA	Radioimmunoassay
SP	Substanz P
Speichel-AA	Speichel-Alpha-Amylase
ZNS	Zentrales Nervensystem

I. EINLEITUNG

Die Kolik stellt einen der häufigsten Notfälle in der Pferdemedizin und folglich eine plötzliche Todesursache bei Pferden dar (Traub-Dargatz et al. 2001, Diakakis & Tyrnenopoulou 2018, Dybkjaer et al. 2022). In einer Untersuchung zur Inzidenz wurde in den USA eine Schätzung von mehr als vier Kolikfällen von hundert Pferden im Jahr ermittelt. Die Sterblichkeitsrate betrug elf Prozent und die jährlichen Kosten, die durch die konservative und chirurgische Behandlung dieser Erkrankung entstanden, wurden auf 115.300.000 Dollar beziffert (Traub-Dargatz et al. 2001). Die Vielzahl an Studien zur akuten Erkrankung des Magen-Darm-Trakts bei Pferden spiegelt dessen Bedeutung wider. Es gibt zahlreiche Veröffentlichungen zu potenziellen Ursachen und Risikofaktoren, die zur Entstehung von Koliken beitragen können (Hudson et al. 2001, Archer & Proudman 2006, Iglesias-García et al. 2022). Bei Auftreten der Erkrankung ist die Prognose des Pferdes von besonderer Bedeutung. Um diese möglichst objektiv einschätzen zu können, werden sogenannte Prognoseparameter untersucht. Darunter zählen einzelne Stress- und Schmerzparameter wie die Herzfrequenz, sowie Laktat und Cortisol aus dem Blut (Hinchcliff et al. 2005, Dunkel et al. 2013, Bowden et al. 2020, Smanik et al. 2022). Es werden aber auch aus mehreren Parametern zusammengesetzte Modelle, wie zum Beispiel der Colic Severity Score, für die Vorhersage der Überlebenschance entwickelt (Furr et al. 1995, Dukti & White 2009, Farrell et al. 2021, Bishop et al. 2022). Zur einheitlichen Analyse der abdominalen Schmerzen wurden daneben klinische Skalen, wie die Equine Acute Abdominal Pain Scale oder die Equine Utrecht University Scale for Composite Pain Assessment erstellt (van Loon & van Dierendonck 2015, Sutton & Bar 2016).

Bisher ist kein einzelner Parameter bekannt, der zuverlässig eine objektive Einschätzung von Kolikpatienten erlaubt. Um Stress und Schmerzen von Pferden mit akutem Abdomen in Zukunft möglichst objektiv und einfach evaluieren zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Biomarker im Zusammenhang mit der Kolikerkrankung untersucht: Substanz P und Alpha-Amylase.

Die Substanz P (SP) ist ein seit 1931 bekannter Neurotransmitter aus der Familie der Tachykinine und spielt bei vielen Funktionen des Körpers eine Rolle (v. Euler & Gaddum 1931, Maggi et al. 1990). Sie ist unter anderem an der Stimulation der

glatten Muskulatur des Darms, der Regulierung des Herz-Kreislauf-Systems und der Modulation neurogener Entzündungen beteiligt (Domeneghini et al. 2004, Steinhoff et al. 2014, Mistrova et al. 2016). Die besondere Bedeutung der Schmerzvermittlung von SP wird im Bereich der Rindermedizin schon seit einigen Jahren untersucht (Hunt & Mantyh 2001, Coetzee et al. 2008, Tschoner & Feist 2022). Bei Pferden wurde bisher nur eine limitierte Anzahl an Studien über SP durchgeführt (Everett et al. 2018, Scholler et al. 2023) und es wurden bislang noch keine Studien im Zusammenhang mit Kolik veröffentlicht.

Die Alpha-Amylase (AA) fungiert als Glykosidhydrolase und trägt somit zur enzymatischen Verdauung von Kohlenhydraten bei (Wolffram 2022). Sie wird in Studien als Biomarker eingesetzt, um die Aktivität eines der großen Stressreaktionssysteme des Körpers, nämlich das autonome Nervensystem, widerzuspiegeln (Fuentes-Rubio et al. 2016, Skoluda et al. 2017). Die Alpha-Amylase wurde im Zusammenhang mit Kolik beim Pferd bisher nur aus dem Speichel, jedoch noch nicht aus dem Blut untersucht (Contreras-Aguilar et al. 2018, Contreras-Aguilar et al. 2019).

Aus diesen Gründen wurden die beiden genannten Biomarker in einer klinischen Studie bei Pferden mit gering-, mittel- und hochgradigen Koliken im Blut bestimmt und als Stress- und Schmerzparameter evaluiert.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Kolik

1.1. Definition Kolik

Der Begriff Kolik beschreibt den Symptomenkomplex der abdominalen Schmerzen. Dabei können die Schmerzen in unterschiedlicher Intensität auftreten. Am häufigsten liegt die Ursache einer Kolik bei Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts, es können aber auch andere Organsysteme Auslöser für diese Symptome sein. In Frage kommen beispielsweise die Harn- und Geschlechtsorgane, verschiedene Infektionskrankheiten, Leber- und Gallengangserkrankungen, Futter- oder Wassermangel oder auch Geburten (Hofmann 2010). Daneben können auch Schmerzen ausgelöst durch Myopathien oder neurologische Erkrankungen einer gastrointestinalen Kolik ähneln (Graubner 2017, Aleman et al. 2018, Valberg 2018). So schrieb Wilhelm Dieckerhoff, ehemaliger Professor der Tierärztlichen Hochschule Berlin, bereits im Jahre 1892, dass zwischen einer symptomatischen, falschen und wahren Kolik unterschieden werden sollte. Als symptomatische Kolik bezeichnete er eine entzündliche Reizung, welche im Darmtrakt zum Beispiel durch Vergiftungen entstand. Als falsche Kolik definierte er Koliksymptome, die durch andere Organe des Abdomens als dem Magen-Darm-Trakt herbeigeführt wurden. Der Begriff der wahren Kolik beschrieb aus dieser historischen Sichtweise, dass die Schmerzen durch eine direkte Erkrankung des Magen- und Darmtrakts ausgelöst wurden (Dieckerhoff 1892). Aus heutiger Sicht wird bei Koliksymptomen zwischen gastrointestinalen Ursachen und Ursachen aus anderen Organen des Körpers unterschieden (Becker et al. 2016).

Die Symptome einer Kolik sind vielfältig und können sich je nach Schweregrad stark unterscheiden. Klassische Symptome sind: Liegen und Umsehen nach dem Bauch, Flehmen, allgemeine Unruhe wie mit den Beinen gegen den Bauch treten oder Scharren mit den Vordergliedmaßen. Bei stärkeren Schmerzen kann plötzliches Niederwerfen und Wälzen vorkommen, in besonders schwerwiegenden Fällen Rückenlage oder Hundesitz-artige Stellung. Schwitzen ist ein weiteres Leitsymptom (Hofmann 2010, Becker et al. 2016).

1.2. Ursachen und Risikofaktoren für Kolik

Im Vergleich zu anderen Haustieren sind Pferde besonders kolikanfällig. Prädisponierend wirken sich dafür unter anderem besondere anatomische Gegebenheiten im Magen-Darm-Trakt des Pferdes aus. Ein Merkmal des Magens ist sein vergleichsweise geringes Fassungsvermögen von 8 bis 15 Litern, abhängig von der Größe des Pferdes. Aufgrund der spitzwinkligen Mündung des Ösophagus in die Kardia und des kräftigen M. sphincter cardiae können Pferde nicht erbrechen und der Magen kann bei primärer oder sekundärer Überladung rupturieren (König & Gerhards 2010). Der Dünndarm ist circa 20 bis 30 Meter lang und kann sich angesichts seines langen Gekröses im Abdomen vergleichsweise frei bewegen. Dabei kann er in physiologisch vorkommende Höhlen, wie zum Beispiel dem Foramen omentale, vorfallen und abgeschnürt werden. Aufgrund der doppelten Hufeisenform und der einzigen Fixierung im Bereich der vorderen Gekrösewurzel kann sich das große Kolon drehen, umschlagen oder im Milz-Nieren-Raum einhaken (Hofmann 2010, Becker et al. 2016). Obstipationen des großen Kolons, eine der häufigsten Kolikformen des Pferdes, treten besonders an den anatomischen Strukturen auf, an welchen sich der Durchmesser des Lumens verringert: in der Beckenflexur, sowie im rechten dorsalen Kolon (White & Dabareiner 1997). Zwischen Magen und Duodenum und auch Ileum und Zäkum bestehen weitere Veränderungen des Lumens, weshalb es im Bereich dieser Strukturen ebenfalls zu Obstipationen kommen kann (Becker et al. 2016).

Neben den besonderen anatomischen Eigenschaften können eine Reihe weiterer Faktoren beim Pferd ursächlich für Kolik sein. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass die Erkrankung in ihrer Entstehung komplex und häufig multifaktoriell bedingt ist (Reeves 1997, Archer & Proudman 2006). Im Zusammenhang mit dem Lebensraum und den Haltungsbedingungen von Pferden treten bestimmte Kolikarten gehäuft auf. Zum Beispiel kommen in Regionen mit sandigem Boden eher Sandkoliken oder auch Enterolithiasis vor (Ragle et al. 1989, Hassel et al. 1999). Die geografische Lage könnte auch in Bezug auf die Breitengrade eine Rolle spielen. In einer Studie wurde bei jedem Grad weiter nördlich eine bis zu 2,4-fach höhere Inzidenz festgestellt. Die Autoren vermuten, dass es mit der dort zunehmend kälteren Temperatur zusammenhängen könnte (Cianci et al. 2021). Insgesamt ist die Beziehung zwischen dem Auftreten von Kolik und der geografischen Lage bisher kaum untersucht. In einer früheren Studie konnte

in den USA kein Unterschied hinsichtlich der verschiedenen Regionen festgestellt werden (Traub-Dargatz et al. 2001). Im Gegensatz dazu kamen in Südschweden Koliken etwas häufiger als in den mittleren und nördlichen Regionen vor (Egenvall et al. 2008). Die Jahreszeit und das Wetter scheinen in manchen Populationen ebenfalls das Auftreten von Koliken zu beeinflussen. Mehrere Studien haben intensive Wetterperioden mit einem erhöhten Aufkommen von Patienten mit akutem Abdomen in Verbindung gebracht (Kaya et al. 2009, Diakakis & Tyrenopoulou 2018, Iglesias-García et al. 2022). Je nach Region werden unterschiedliche Jahreszeiten angegeben, in welchen ein höheres Vorkommen von Koliken verzeichnet wurde, wie etwa der Frühling in Griechenland oder der Sommer in Spanien (Diakakis & Tyrenopoulou 2018, Iglesias-García et al. 2022). Heiße Temperaturen wurden in einer Studie aus Österreich als ein Risikofaktor für die Erkrankung identifiziert (Kaya et al. 2009). In einer Zeitspanne von drei Jahren wurde in einer Region Nordgriechenlands der Zusammenhang zwischen Temperaturschwankungen, der relativen Luftfeuchtigkeit und der Entstehung von Koliken untersucht. Es wurde eine signifikante Korrelation zwischen abrupten Schwankungen der Temperatur und dem Auftreten von Kolikeyepisoden festgestellt. Eine Verbindung zur relativen Luftfeuchtigkeit bestand hingegen nicht (Diakakis & Tyrenopoulou 2018). Eine eindeutige Begründung für diese Phänomene ist bislang nicht geklärt, verschiedene Zusammenhänge werden diskutiert. In mehreren Tiermodellen konnte eine Verbindung zwischen witterungsbedingtem Stress und dem antioxidativen Abwehrsystem hergestellt werden. Hyperthermie, aber auch Kälte kann zu Veränderungen in der gastrointestinalen Mikroflora und damit zu Störungen in Struktur und Funktion des Darmtrakts führen (Moro et al. 1998, Oliver et al. 2012). Daneben kann Temperaturstress Entzündungsreaktionen im Duodenum, Jejunum und Ileum auslösen (Fu et al. 2013). Andere Autoren beschreiben ein gestörtes Vegetativum mit der Folge von schmerzhaften Krämpfen durch meteorologische Veränderungen wie plötzliche Wetterumschwünge (Becker et al. 2016).

Neben den umweltbedingten Einflüssen gibt es einige Risikofaktoren, welche das Signalement des Pferdes betreffen. Das Lebensalter der Pferde wird in der Literatur immer wieder aufgegriffen, wobei sehr unterschiedliche Angaben zu finden sind (Curtis et al. 2019). Cohen et al. gibt an, dass mit einem Alter von über 10 Jahren eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine Kolik besteht, in einer anderen Studie

werden wiederum Pferde im Alter von zwei bis 10 Jahren mit einem größeren Risiko beschrieben (Tinker et al. 1997, Cohen et al. 1999). Ältere Tiere, insbesondere Wallache und Ponys, neigen beispielsweise aufgrund ihres erhöhten viszeralen Fettgehalts eher zu einer Strangulation durch ein Lipoma pendulans (Edwards & Proudman 1994). Manche Rassen, wie zum Beispiel Araber, scheinen generell ein gesteigertes Risiko für die Entwicklung von Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts zu haben (Reeves et al. 1996, Cohen et al. 1999). Eine Prädisposition für manche Kolikformen ergibt sich aus der Körpergröße. Großrahmige Tiere erkranken häufiger an einer Darmverlagerung in das Foramen epiploicum als kleinere (Archer et al. 2008). Hingegen neigen koppelnde Pferde eher zu Obstipation oder Meteorismus des Kolons. Diese Verhaltensstörung kann eine intraabominale Ansammlung von Luft bewirken und außerdem die Wahrscheinlichkeit für eine Inkarzeration in das Foramen epiploicum erhöhen (Hillyer et al. 2002, Archer et al. 2004). Frühere Kolikerkrankungen oder Parasitenbefall sind ebenfalls bekannte Risikofaktoren (Tinker et al. 1997, White 2009, Purnama et al. 2021).

Ein Review Artikel von Curtis et al. erörterte, dass besonders das Management von Pferden und dessen Änderungen ein hohes Potenzial für Kolikursachen besitzt (Curtis et al. 2019). Beispielsweise wird die Motilität des Darms nachweislich durch die Umstallung der Pferde von der Koppel in den Stall verringert (Williams et al. 2015). Zudem weisen Pferde, die das ganze Jahr über Zugang zur Weide haben, ein vermindertes Risiko für Koliken auf (Cohen et al. 1999, Hudson et al. 2001, Scantlebury et al. 2015). Neben der Haltung des Pferdes kommen den Futtermitteln und der Fütterungspraxis allgemein wichtige Rollen im Management zu (Archer & Proudman 2006, Curtis et al. 2019). Die Aufnahme von konzentrierten Futtermitteln, sowie schlechte Heuqualität können das Auftreten von akuten abdominalen Erkrankungen begünstigen (Kaya et al. 2009, Purnama et al. 2021). Die Fütterung von Getreide nach dem Koppelgang ist ebenfalls mit Risiko behaftet, während der Weideaustrieb nach der Kraftfuttergabe das Vorkommen von Koliken hingegen reduzieren kann (White 2009). Der freie Zugang zu Wasser stellte sich in verschiedenen Studien ebenso als wichtiger Faktor heraus (Reeves et al. 1996, Kaya et al. 2009, Purnama et al. 2021). Bei reduzierter Wasseraufnahme kann eine systemische Dehydratation und der infolgedessen auftretende trockene Kot das Risiko von Koliken, insbesondere Obstipationen,

erhöhen (Kaya et al. 2009, Williams et al. 2015). Zum Management gehören daneben auch regelmäßige Kontrollen der Zahngesundheit. Es hat sich gezeigt, dass Zahnerkrankungen signifikant mit dem Auftreten von Koliken in Zusammenhang stehen (Purnama et al. 2021).

Aufgrund von Stress und intensivem Training können Pferde auch eher dazu neigen, an Koliken zu erkranken. So leiden zum Beispiel 93 % der Distanzpferde aus höheren Leistungsklassen während der Rennsaison an Magengeschwüren (Cohen et al. 1999, Tamzali et al. 2011). Auch bei Rennpferden ist das regelmäßige Vorkommen von Ulzerationen im Magen bekannt. In einer Studie wurde bei 100 Prozent der zufällig ausgewählten und untersuchten Vollblüter zwei Tage nach einem Rennen Ulzerationen festgestellt (Hwang et al. 2022). Auch im Zusammenhang mit Turnieren und dem damit verbundenen Transport steigt die Gefahr von Koliken. Innerhalb von 24 Stunden nach einem Transport haben Pferde ein erhöhtes Risiko, an einer Kolik zu erkranken (Hillyer et al. 2002).

Insgesamt sind viele verschiedene Faktoren bekannt, welche Koliken begünstigen können. Nicht alle davon sind durch den Menschen beeinflussbar, wie zum Beispiel das Wetter oder intrinsische Faktoren. Viele wichtige Parameter wie zum Beispiel die Fütterung und Haltung können jedoch vom Besitzer kontrolliert und verändert werden (Hudson et al. 2001, Gonçalves et al. 2002).

1.3. Untersuchungsgang Kolik

Bei der klinischen Untersuchung eines Kolikpatienten sind besonders der Allgemeinzustand, das Herz-Kreislauf-System und das Abdomen im Fokus. Die systematische Untersuchung muss an den jeweiligen Zustand des Patienten angepasst werden und hat die ätiologische Diagnose als Ziel (Hofmann 2010, Becker et al. 2016).

Nach der Anamnese erfolgt die klinische Allgemeinuntersuchung. Besonders relevant sind die Schleimhäute, die kapilläre Rückfüllzeit und der Hautturgor, die Herz- und Atemfrequenz, sowie die Körpertemperatur (Hofmann 2010, Becker et al. 2016). Die Auskultation der Quadranten des Abdomens gibt Aufschluss über die Motilität des Darms. Links dorsal ist physiologischer Weise das aufsteigende Kolon zu hören, links ventral dumpf brummende Geräusche der Beckenflexur (Sanchez 2018). Rechts dorsal kann das ileocaecale Einspritzgeräusch beim gesunden Pferd ein- bis dreimal pro Minute auskultiert werden. Ventral im rechten Quadranten sind

physiologischer Weise peristaltische Wellen des Zäkums zu vernehmen. Während des Abhörens kann die Perkussion zur Identifizierung von gasgefülltem Darm hilfreich sein (Sanchez 2018). Bei Hengsten ist die Palpation des Skrotums obligatorisch (Hofmann 2010, Becker et al. 2016).

Anschließend sollte immer die Magensondierung per Nasenschlundsonde erfolgen. Sie hat einerseits diagnostischen Wert, da man ausströmendes Gas und abfließende Flüssigkeit bewerten kann. Andererseits kann so eine Ruptur des Magens verhindert werden (Sanchez 2018). Das Gas riecht im Normalfall aromatisch-säuerlich. Bis zu zwei Liter Magenflüssigkeit sind beim Pferd normal, darüberhinausgehend spricht man von Reflux. Der pH-Wert des Mageninhalts ist physiologisch sauer (pH-Wert < 5), bei einem Rückfluss von Dünndarminhalt in den Magen, beispielsweise durch einen Ileus, wird der pH-Wert alkalisch (pH-Wert > 7). Die Farbe der Flüssigkeit kann ebenfalls erste Hinweise auf die Erkrankung geben (Hofmann 2010, Becker et al. 2016). So ist beispielsweise bei einer Gastroduodenojejunitis der Mageninhalt bräunlich-rötlich verfärbt.

Bei der transrektalen Untersuchung wird zunächst die Kotbeschaffenheit, wenn vorhanden, im Rektum beurteilt (Dallap-Schaer & Orsini 2014). Nach dem Entleeren des Mastdarms kann das Abdomen des Pferdes auf Armeslänge systematisch abgetastet werden. Es sind der kaudale scharfe Rand der Milz, die linke Niere und das Milz-Nierenband tastbar, hier sollte auf eine mögliche Milz-Nieren-Raum-Verlagerung untersucht werden (Dallap-Schaer & Orsini 2014). Die Aorta abdominalis und eventuell auch die kraniale Gekrösewurzel sind ebenfalls palpierbar. Das Colon ascendens und descendens sowie das Zäkum werden auf Lage und Füllungszustand überprüft. Die Taenien sind hier zur Identifikation der verschiedenen Darmteile hilfreich (Hofmann 2010, Becker et al. 2016). Dünndarm ist, außer in manchen Fällen das Ileum beim gesunden Pferd, physiologisch von transrektal nicht fühlbar (Dallap-Schaer & Orsini 2014). Bei Palpation von Dünndarm wird auch dieser auf Lage, Inhalt und Größe beurteilt. Speziell bei tragenden Stuten werden Uterus und Ovarien untersucht. Bei Hengsten sollten auch die Leistenringe ertastet werden (Hofmann 2010, Becker et al. 2016).

Für die Ultraschalluntersuchung hat sich in vielen Kliniken das sogenannte FLASH-Protokoll (Fast Localised Abdominal Sonography of Horses) etabliert (Busoni et al. 2011). Um Zeit zu sparen, werden bei dieser Untersuchung in sieben Lokalisationen die relevantesten Bereiche der Kolikpatienten gescannt. Das

ventrale Abdomen wird besonders auf freie Flüssigkeit überprüft und im Magenfenster auf der linken Seite im Bereich des 10. Interkostalraumes (IKR) jeweils nach kranial und kaudal die Größe des Magens bestimmt. Anschließend platziert man die Ultraschallsonde im Bereich des 17. IKRs, um die Lage der Milz sowie den Milz-Nieren-Raum zu evaluieren. Als letztes wird auf der linken Seite im mittleren Drittel das Abdomen geschallt. Der Dickdarm kann auf Ausdehnung und Wanddicke (diese sollte unter 0,6 cm sein) hin beurteilt werden. Amotile, gestaute Dünndarmschlingen können Hinweis auf eine ernste Erkrankung, wie beispielsweise einen Ileus geben. Das Duodenum kann auf der rechten Seite im Bereich der 14.-15. IKR zwischen Leber und der dorsalen Kolonlage aufgesucht werden. Physiologischer Weise kontrahiert das Duodenum 2- bis 2,5-mal pro Minute und hat ein flaches Erscheinungsbild. Die Wanddicke des Dünndarms sollte allgemein weniger als 0,3 cm betragen. Als nächstes wird äquivalent zur anderen Seite ebenfalls das mittlere Drittel des Abdomens untersucht. Das letzte Feld befindet sich rechts kranio-ventral am Thorax zum Ausschluss von freier Flüssigkeit in diesem Bereich (Busoni et al. 2011, Scharner 2011).

Falls es bei den vorangegangenen Untersuchungen noch nicht möglich war, eine sichere Diagnose zu stellen, kann die Abdominozentese ergänzende Befunde liefern. Auffällige Befunde in der Ultraschalluntersuchung, wie beispielsweise vermehrt freie Flüssigkeit in der Bauchhöhle, sind eine weitere Indikation zur Entnahme von Bauchhöhlenflüssigkeit. Nach steriler Vorbereitung kann die Parazentese in der Medianen am tiefsten Punkt des Abdomens durchgeführt werden. Makroskopisch sollte das gewonnene Punktat hellgelb und klar sein. Der Eiweißgehalt liegt physiologischer Weise zwischen 0,5 und 2,5 g/dl, die Zellzahl (Leukozytenzahl) zwischen 3 und 3,5 G/l beziehungsweise je nach Literatur bis zu 5 G/l (Hofmann 2010, Stokol 2014, Becker et al. 2016). Die Bestimmung der Laktat-Konzentration im Bauchhöhlenpunktat kann Aufschluss über die Qualität der intestinalen Perfusion und damit Hinweise auf das Vorliegen einer Ischämie geben (Delesalle et al. 2007).

Zur weiteren Evaluation des Gesamtzustandes wird nach Möglichkeit ein Notfalllabor eingeleitet. Besonders Hämatokrit, Totalprotein und Laktat sind ausschlaggebend für die Therapie und Prognosestellung. Mithilfe des Hämatokrits und des Totalproteins kann zum Beispiel in Kombination mit dem klinischen Erscheinungsbild eine Dehydratation festgestellt werden (Hofmann 2010, Cavalleri

et al. 2013, Becker et al. 2016). Der Referenzbereich des Hämatokrits befindet sich beim Warmblutpferd zwischen 35 und 40 L/L, der Normalbereich des Totalproteins bei 56 bis 76 g/l (Deegen & Glitz 2010). Bei steigendem Hämatokrit und gleichzeitigem Absinken des Totalproteins wird von einem Verlust des Proteins (meist Albumin) über die geschädigte Darmwand ausgegangen. Die physiologische Laktat-Konzentration bei einem Pferd in Ruhe beträgt weniger als 1,3 mmol/l (Moore et al. 1976). Eine Erhöhung des Laktats entsteht aus der anaeroben Glykolyse infolge von Hypoxie. Bei Kolikpatienten kann eine verminderte intestinale Perfusion ursächlich dafür sein (Delesalle et al. 2007, König & Gerhards 2010). Veränderungen des Säure-Base-Haushalts und der Elektrolyte sind durch eine Blutgasanalyse erkennbar (Cavalleri et al. 2013).

Das Ansprechen auf eine diagnostisch-therapeutische Medikation, die meist mit kurz wirksamen Schmerzmitteln wie beispielsweise Novaminsulfon durchgeführt wird, und besonders der Verlauf der Erkrankung sind für das weitere Vorgehen hilfreich. Je nach Indikationsstellung kann diagnostisch weiterführend eine Röntgenuntersuchung angeschlossen werden. Diese ist jedoch beim adulten Pferd nur sinnvoll, wenn der Verdacht auf eine Sandansammlung im Kolon besteht, da die Schichtdicke beim Pferd ansonsten zu hoch ist. Bei Fohlen kann die radiologische Untersuchung jedoch wertvolle Erkenntnisse liefern. Bestehen nach Durchführung der vorangegangenen Untersuchungen Hinweise auf eine Magenerkrankung, kann das Pferd einer Gastroskopie unterzogen werden. Am Ende aller Untersuchungen wird entweder die konservative oder chirurgische Therapie eingeleitet. Falls konservativ keine Heilung erzielt werden kann, besteht als letzte diagnostisch-therapeutische Option die Laparoskopie oder Laparotomie (Hofmann 2010, Becker et al. 2016).

1.4. Kolikformen

Erkrankungen des Magens

Verschiedene Erkrankungen des Magens können neben denen des Darms ebenfalls Koliksymptome auslösen. Eine Magenschleimhautentzündung, die Gastritis, kann entweder akut oder chronisch auftreten. Sie entsteht unter anderem durch die Eingabe von reizenden Medikamenten, durch Fütterungsfehler oder auch sekundär bei anderen Allgemein- oder Darmerkrankungen. Die Symptome können eine gestörte oder sistierende Futteraufnahme, postprandiale Koliksymptome und

vermehrtes Gähnen, Lecken und Flehmen sein (Becker et al. 2016). In einer retrospektiven Studie wurden die Daten von 3715 obduzierten Pferden, welche aus unterschiedlichen Gründen in Pferdekliniken euthanasiert werden mussten, ausgewertet. Bei 6,7 % der Pferde wurde eine Gastritis festgestellt. Die meisten dieser Pferde hatten vorberichtlich eine Erkrankung des Magen-Darm-Trakts, aber auch andere Vorerkrankungen, beispielsweise des Urogenital-Trakts oder des Herz-Kreislauf-Systems wurden dokumentiert (Sandin et al. 2000).

Insgesamt scheint eine Gastritis im Gegensatz zu ulzerativen Erkrankungen des Magens seltener eine klinische Rolle zu spielen (Sanchez 2018). Die ulzerativen und entzündlichen Magenschleimhautentzündungen werden als Equine Gastric Ulcer Syndrome (EGUS) zusammengefasst (Andrews et al. 1999). Eine Unterteilung in Equine Squamous Gastric Disease (ESGD), die kutane Schleimhaut, und Equine Glandular Gastric Disease (EGGD), die glanduläre Schleimhaut betreffend, beschreibt die jeweilige betroffene anatomische Struktur des Magens (Luthersson et al. 2009, Merritt 2009, Sykes et al. 2015). Es können aber auch beide Erkrankungen in Kombination auftreten (Luthersson et al. 2009). Die ESGD kann primär und auf die Erkrankung des Magens selbst begrenzt oder sekundär, zum Beispiel durch eine verzögerte Magenentleerung, vorkommen. Die Pathogenese von ESGD basiert grundsätzlich auf der Tatsache, dass die kutane Schleimhaut vermehrt der Magensäure ausgesetzt wird (Sykes et al. 2015). Je nach Tiefe kann zwischen erosiven, bis zur Basalmembran des Plattenepithels, und ulzerativen, bis in die Tela submucosa reichenden Läsionen, differenziert werden (Becker et al. 2016). Im Gegensatz zu ESGD zeigt die histologische Untersuchung von glandulären Läsionen eher eine entzündliche als eine ulzerative Pathologie (Martineau et al. 2009, Crumpton et al. 2015). Außerdem ist die makroskopische Erscheinung für die Schwere der Erkrankung nicht unbedingt repräsentativ (Crumpton et al. 2015). Daher wird empfohlen, die Läsionen von EGGD nicht wie die von ESGD in Grade einzuteilen, sondern diese vielmehr zu beschreiben (Vokes et al. 2023). Der genaue Hergang der EGGD ist noch nicht vollständig verstanden. Sie kann zum Beispiel im Zusammenhang mit einer Entzündung des Dünndarms und Gewichtsverlust einhergehen (Banse et al. 2023). EGGD-Läsionen entstehen vor allem durch die verminderte Durchblutung der Schleimhaut und folglich reduziertem Abtransport von Wasserstoffionen nach Gabe von nichtsteroidalen Antiphlogistika (Wallace et al. 2000, Whitfield-Cargile et al. 2021). Die Ätiologien

von ulzerativen Entzündungen des Magens sind vielfältig, sie stehen besonders im Zusammenhang mit Haltung, Fütterung und Trainingsintensität (Sykes et al. 2015). In der oben erwähnten Studie von Sandin et al. wurden bei 17 % der obduzierten Pferde Magenulzera erfasst. Es konnte eine signifikante Verbindung zu Koliksymptomen festgestellt werden (Sandin et al. 2000). Auch rezidivierende, postprandiale abdominale Schmerzen wurden mit EGUS assoziiert (Videla & Andrews 2009).

Koliken mit der Futteraufnahme einhergehend, können ebenfalls durch Neoplasien im Bereich des Magens vorkommen, wobei am häufigsten Plattenepithelkarzinome vorliegen (Becker et al. 2016). Durch Tumore, aber auch Ulzerationen im Bereich des Pylorus oder Duodenums kann eine Magenentleerungsstörung entstehen (McGill & Bolton 1984, Sanchez 2018). Andernfalls kann eine verminderte Magenentleerung als Folge einer viszeralen Neuropathie vorkommen. Bei chronischer Magenüberladung kann eine sogenannte Magendilatation die Folge sein. Die akute Magenüberladung entsteht entweder primär zum Beispiel nach exzessiver Futteraufnahme oder sekundär durch Reflux aus dem Dünndarm (Becker et al. 2016, Sanchez 2018). Erhebliche Koliksymptome sind zu beobachten, bevor es durch eine primäre oder sekundäre Überladung des Magens zu einer letalen Magenruptur kommt (Winfield & Dechant 2015).

Erkrankungen des Darms

Einige Erkrankungen des Darms, welche Kolik auslösen oder im Zusammenhang mit abdominalen Schmerzen beim Pferd auftreten, können verschiedene Abschnitte des Darmtrakts betreffen. Die Enteritis, ein Komplex aus katarrhalischen und entzündlichen Darmerkrankungen, kann im Bereich des Dün- oder Dickdarms und akut oder chronisch auftreten. Das Leitsymptom ist fast immer Durchfall oder Kotwasser und die spastischen Darmkontraktionen können unterschiedlich starke Koliksymptome hervorrufen (Becker et al. 2016, Sanchez 2018).

Die sehr häufig auftretende Krampf- oder spastische Kolik beschreibt kurze, aber starke abdominale Schmerzen in Verbindung mit Hypermotilität (Abutarbush et al. 2005, Diakakis & Tyrnenopoulou 2018). Die gestörte Darmfunktion, welche mit erhöhtem Vagotonus einhergeht, kann durch viele verschiedene äußere Einflüsse, wie zum Beispiel Wetterwechsel, Managementfehler oder auch stress-bedingt auftreten. Sie entwickelt sich aber hinsichtlich der starken Symptome nach

diagnostisch-therapeutischer Gabe von Spasmolytika meistens positiv (Becker et al. 2016).

Gaskoliken treten primär oder sekundär auf und können unterschiedliche Grade entwickeln. Der primäre Meteorismus ist zumeist alimentär bedingt. In Folge verschiedener Ileuszustände resultiert prästenotisch ein sekundärer Meteorismus. Klinik, Prognose und Therapie kommen auf Ausprägung und Ursache an (Becker et al. 2016). Eine Aufgasung, besonders im Bereich des Dickdarms, kann zu Verlagerungen oder Torsion führen, die schwerwiegendere Koliken nach sich ziehen (Sanchez 2018).

Fremdkörper im Magen-Darm-Trakt kommen beim Pferd insgesamt selten vor. Sie sollten im Zusammenhang mit Peritonitis und intraabdominalen Abszessen als Differenzialdiagnose in Betracht gezogen werden (Marley et al. 2018). Die Obturatio intestini, eine Darmverlegung durch fremdkörperartige Gebilde, kommt in Form von Enterolithen, Phytobezoaren oder Futter-Konglobaten vor (Becker et al. 2016).

Ein intramurales Hämatom tritt ebenfalls selten auf und kann zum Ileus oder im gravierendsten Fall zum Tod durch Verblutung führen (Speirs et al. 1981, Becker et al. 2016).

Innere Hernien beschreiben zumeist Dünndarm-, seltener Dickdarmanteile, welche sich durch eine Bruchpforte hindurch in der Brust- oder Bauchhöhle einklemmen. Am häufigsten kommen die Hernia foraminis omentalis, die auch als Inkarzeration in das Foramen epiploicum bezeichnet wird, und die Hernia spatii renolienalis, allgemein als Milz-Nieren-Raum-Verlagerung bekannt, vor. Während in das Foramen omentale normalerweise unterschiedlich lange Dünndarmteile inkarzeriert werden, verlagert sich zumeist das Colon ascendens in den Milz-Nieren-Raum. Die erstbeschriebene Hernie geht durch den auftretenden Ileus mit hochgradigen Koliksymptomen einher und macht eine chirurgische Intervention erforderlich (Becker et al. 2016, Sanchez 2018). Im Gegensatz dazu kann eine Hernia spatii renolienalis häufig auch konservativ gelöst werden (Fultz et al. 2013). Weitere innere Hernien sind beispielsweise die Hernia mesenterialis, Hernia omentalis, Hernia ligamentosa, Hernia pseudoligamentosa oder die Hernia diaphragmatica (Becker et al. 2016). Zu den äußeren Hernien gehört die häufig beim Fohlen vorkommende Hernia umbilicalis. Inkarzerationen von Dün- oder

Dickdarm in diese Bruchpforte hinein sind zwar selten, können aber vorkommen (Freeman et al. 1988, Sanchez 2018). Bei Hengsten, aber auch Wallachen kann Dünndarm, zumeist Jejunum oder Ileum, in den Processus vaginalis gleiten und eine Hernia inguinalis hervorrufen. Daher sollte bei männlichen Tieren mit Koliksymptomatik immer eine Palpation des Skrotums und der Samenstränge erfolgen. Die Hernie kann oft auch transrektal palpiert werden und stellt durch den daraus resultierenden Dünndarmileus eine lebensbedrohliche Situation dar (Becker et al. 2016). Andere äußere Hernien wie die Hernia scrotalis, Hernia femoralis, verschiedene Formen der Hernia ventralis und die Hernia perinealis kommen seltener vor (Becker et al. 2016).

Invaginationen, Einstülpungen eines Darmteils in das Lumen eines anderen, treten an verschiedenen Abschnitten des Dünn- oder Dickdarms auf, wobei oftmals das Ileum als Invaginat vom Cecum aufgenommen wird (Ford et al. 1990). Diese Form der Kolik kann akut oder chronisch auftreten oder bei jungen Tieren sogar als Zufallsbefund im Ultraschall auftauchen (Abraham et al. 2014, Sanchez 2018).

Nicht-strangulierende Infarkte der Darmwand können aufgrund akuter Mangel durchblutung durch Verschluss der Darmarterien oder seltener auch -venen, auftreten. Einer solchen thrombotisch-embolischen Kolik folgt die ischämische Darmnekrose mit anschließender Peritonitis (Becker et al. 2016). Eine Infektion mit *Strongylus vulgaris* konnte in mehreren Studien als signifikante Ursache für nicht-strangulierende Infarkte evaluiert werden (Nielsen et al. 2016, Pihl et al. 2018). Die Larven migrieren in den Wänden der Mesenterialarterien und lösen dort eine Arteritis aus, welche folgend zu Thrombosen und Embolien in unterschiedlichem Ausmaß führen kann (Drudge 1979).

Andere Krankheiten der Bauchhöhle wie Peritonitis, intraabdominale Verletzungen, Blutungen, Tumore oder Abszesse können neben weiteren Symptomen wie Fieber und Inappetenz auch Koliksymptome verursachen (Becker et al. 2016).

Die Graskrankheit (Equine Grass Sickness), welche auch als Equine Dysautonomie bezeichnet wird, stellt eine weide-assoziierte multisystemische Neuropathie dar. Sie kann von perakut bis chronisch verlaufen und je nach Form mit Kolik, Schwitzen, vermehrter Salivation, hochgezogenem Abdomen und weiteren Symptomen einhergehen (McGorum & Pirie 2018). Die Ätiologie ist nicht sicher

geklärt, es wird jedoch vermutet, dass die Toxine von *Clostridium botulinum* oder auch Mykotoxine eine Rolle spielen (Hunter et al. 1999, Pirie et al. 2014, Pirie & McGorum 2016).

Kolikformen des Dünndarms

Die im Dünndarm von Pferden vorkommende hämorrhagische Enteritis wird als Gastroduodenojejunitis oder auch proximale Enteritis beschrieben. Der betroffene Darmabschnitt reagiert mit einem funktionellen, paralytischen Ileus. Infolgedessen kommt es zu Reflux und durch die schnell eintretende Magenüberladung zu Koliksymptomen. Oftmals ist der Mageninhalt durch die hämorrhagische Entzündung des Magen-Darm-Trakts braun-rötlich gefärbt. Die Abgrenzung zu einem mechanisch bedingten Dünndarmverschluss ist aufgrund der unterschiedlichen Therapie wichtig (Becker et al. 2016, Arroyo et al. 2018).

Auch wenn mit einer Obstipation vornehmlich eine Verstopfung des großen Kolons gemeint ist, können Ansammlungen von eingetrockneter Ingesta ebenso im Dünndarm auftreten. Meistens sind diese an Übergängen im Darmtrakt lokalisiert, an denen sich der Durchmesser des Lumens verkleinert (Plummer 2009). Am häufigsten tritt die nicht-strangulierende Obstruktion des Dünndarms im Bereich des Ileums vor dem Ostium ileale zum Zäkum hin auf (Abutarbush et al. 2005).

Ein Volvulus mesenterialis beschreibt eine Rotation des Dünndarms, häufig des Jejunums oder Ileums um die eigene Mesenterialachse (Sanchez 2018). Die Drehung kann zwischen 180° und 360° oder vereinzelt auch mehr vorkommen (Stephen et al. 2004). Seltener kommt es zum Volvulus nodosus, bei welchem sich die kaudalen Anteile des Dünndarms verknoten und dadurch strangulieren (Archer 2017). Das Lipoma pendulans, eine Sonderform der Hernia pseudoligamentosa, ist eine weitere und regelmäßig vorkommende strangulierende Erkrankung des Dünndarms (Garcia-Seco et al. 2005, Becker et al. 2016). Die Lipome sind gutartige Hyperplasien und bilden sich zwischen den Blättern des Mesenteriums. Folglich kommen sie insbesondere bei älteren Tieren, in der Literatur werden 17 bis 18,7 Jahre als Durchschnitt angegeben, vor (Abutarbush et al. 2005, Garcia-Seco et al. 2005, Sanchez 2018). Strangulierende Ileus-Formen sind prä-operativ kaum voneinander zu unterscheiden und verursachen akute, hochgradige Koliksymptome (Sanchez 2018).

Kolikformen des Dickdarms

Die equine Typhlokolitis ist eine hämorrhagische Enteritis mit akutem bis perakutem Verlauf. Sie tritt häufig in Folge unterschiedlichster Stresssituationen auf und geht mit Schocksymptomen, Kolik und schließlich Diarrhö einher. Differenzialdiagnostisch kommen zur idiopathischen Typhlokolitis verschiedene infektiöse Erkrankungen durch beispielsweise Salmonellen oder Clostridien vor (Becker et al. 2016, Shaw & Stämpfli 2018).

Im Bereich des Dickdarms treten Obstipationen am häufigsten in der Beckenflexur des aufsteigenden Kolons oder am Übergang vom rechten dorsalen Kolon zum Colon transversum auf (Plummer 2009). Die Obstipation des großen Kolons wird in der Literatur oft als die häufigste Kolikursache überhaupt angegeben, die Zahlen variieren zwischen 20,8 % und 43,2 % (Abutarbush et al. 2005, Gitari et al. 2017, Dybkjaer et al. 2022). Differenzialdiagnostisch ist bei der transrektalen Untersuchung dringend eine primäre von einer sekundären Anschoppung zu unterscheiden. Während eine primäre Obstipation frühzeitig behandelt meist eine gute Prognose hat, liegt einer sekundären Eintrocknung möglicherweise eine schwerwiegende Erkrankung zugrunde (Plummer et al. 2007). Die Obstipation des Zäkums ist die am häufigsten vorkommende Erkrankung dieses Darmabschnitts. Sie ist verbunden mit einer im Vergleich zu Obstipationen des Colon ascendens schlechteren Prognose, sowie einer hohen Rupturgefahr (Plummer et al. 2007). Das Colon descendens ist insgesamt seltener betroffen, dessen häufigste Erkrankung stellt allerdings auch die Obstipation dar. Die Überlebensrate einer Obstipation in diesem Darmabschnitt wird mit bis zu über 90 % angegeben (Frederico et al. 2006, Plummer et al. 2007).

Mit einer Torsion wird eine Drehung um die longitudinale Achse des Darms selbst bezeichnet (Sanchez 2018). Im Bereich des Zäkums sind die Torsion und auch eine kaudale Abknickung der Blinddarmspitze, Flexio caeci, selten (Becker et al. 2016). Hingegen sind Verlagerungen und Torsionen des Colon ascendens oft vorkommende Kolikformen (Abutarbush et al. 2005). Bei einer Drehung von über 270° kommt es zu einer starken Tympanie und folglich zu einer Ausdehnung des Abdomens. Diese kann die Respiration einschränken und Druck auf die Vena cava caudalis ausüben (Sanchez 2018). Stuten post partum scheinen durch das plötzlich vorhandene Platzangebot im Bauchraum ein erhöhtes Risiko für diese Art der Kolik zu haben (Snyder et al. 1989). Bei einer (Retro-) Flexio coli ascenditis oder auch

Verlagerungen des großen Kolons sind die Symptome im Vergleich zur Torsion milder, da die venöse Stauung und die Lumeneinengung geringer sind (Becker et al. 2016).

Neben klar definierbaren Kolikformen werden oftmals Patienten vorgestellt, bei denen eine eindeutige Diagnosestellung nicht möglich ist. Pferde mit rezidivierender Kolik unbekannter Genese kommen vielfach vor. Kürzlich veröffentlichte Studien implizieren, dass bei der Mehrzahl dieser Pferde eine entzündliche Darmerkrankung und verkürzte Zotten im Duodenum zugrunde liegen können (Stewart et al. 2018, Siwińska et al. 2022). In der Studie von Siwińska et al. wurde mit Hilfe von Biopsien bei einem Viertel der 77 untersuchten Pferde mit rezidivierender Kolik verkürzte Zotten festgestellt (Siwińska et al. 2022). Daneben können beispielsweise Verklebungen nach vorangegangenen chirurgischen Eingriffen, Schädigung der Innervation und Blutversorgung durch Parasiten, ein labiles Vegetativum, sowie nicht gastrointestinale Erkrankungen ursächlich sein (Becker et al. 2016, Mair & Sherlock 2023).

1.5. Prognoseparameter bei Kolik

Um die Prognose von Kolikpatienten im Verlauf der Symptomatik besser einschätzen zu können, werden ständig neue Hilfsmittel in Betracht gezogen. Verschiedene Studien untersuchten dabei sowohl einzelne Parameter als auch die Kombination mehrerer Faktoren zur Diagnosestellung (Tinker et al. 1997, Mair et al. 2014, Bowden et al. 2020, Dybkjaer et al. 2022).

Signalement & Vorbericht

Das Signalement betreffend haben zum Beispiel Rassen wie Kaltblüter, Vollblüter und Vollblut-Kreuzungen schlechtere Prognosen als andere Pferderassen (Proudman et al. 2006). Das Alter der Kolikpatienten wurde in mehreren Studien als Indikator für einen negativen Ausgang der Erkrankung bewertet (Proudman et al. 2006, Drumm et al. 2013, Bowden et al. 2020). Southwood et al. gibt an, dass adulte Pferde im Alter von vier bis 15 Jahren eine Kolik durchschnittlich zu 76 % überleben, Patienten mit über 16 Jahren dagegen nur zu 59 % (Southwood et al. 2010). Erklärungen dafür können eine allgemein schlechtere Kondition und Vorerkrankungen bei älteren Pferden, sowie das häufigere Vorkommen von Erkrankungen wie Lipoma pendulans oder Neoplasien sein (Edwards & Proudman 1994, Knowles et al. 2016, Bowden et al. 2020).

Eine retrospektive Studie analysierte mehrere Risikofaktoren für die Notwendigkeit einer chirurgischen Intervention bei Kolikpatienten. In dem prä-operativen Modell stellten sich folgende Variablen in Bezug auf den Vorbericht im Zusammenhang mit der Mortalität als signifikant heraus: die Jahreszeiten Sommer und Winter, eine Entfernung von über 70 Kilometern zur Klinik und ein Alter der Patienten von über 9 Jahren (Iglesias-García et al. 2022). Weitere Studien liefern Hinweise, dass post-operative Komplikationen zu bestimmten Jahreszeiten gehäuft auftreten (Archer & Proudman 2006, Muñoz et al. 2008). In Spanien traten beispielsweise im Herbst die meisten Endotoxinämien und im Sommer am häufigsten Hufrehe als Komplikationen nach Laparotomien auf (Muñoz et al. 2008).

Die Relevanz der Transportzeit zur Klinik und der Gesamtdauer der Erkrankung werden durch andere Forschungsgruppen bestätigt (Wormstrand et al. 2014, Hackett et al. 2015).

Kolikform

In einem zweiten intra-operativen, multivariablen Modell von Iglesias-García et al. korrelierten die Art der Läsion, dabei insbesondere Strangulationen, und die Lokalisation der Erkrankung im Bereich des Dünndarms signifikant mit einer gesteigerten Mortalitätsrate (Sutton et al. 2009, Iglesias-García et al. 2022). Obstipationen des Dünndarms haben im Vergleich zu jenen im Dickdarm eine höhere Wahrscheinlichkeit für post-operative Komplikationen wie Ileus, vermehrte Schmerzen und Schock (Mair & Smith 2005, Wormstrand et al. 2014). Wenn Darmteile während der Operation ischämische Läsionen aufweisen, folgen post-operativ signifikant höhere Herzfrequenzen, welche wiederum mit einer schlechteren Prognose einhergehen (McConachie et al. 2016).

Klinische Untersuchung

Die Herzfrequenz stellt einen zentralen Baustein in zahlreichen Prognosemodellen dar (Wormstrand et al. 2014, Nikvand et al. 2019, Bowden et al. 2020, Farrell et al. 2021, Bishop et al. 2022). Eine hohe Herzfrequenz wird signifikant mit erhöhter Mortalität bei Pferden mit akutem Abdomen verknüpft, wobei in Studien unterschiedliche Grenzwerte, zum Beispiel zwischen 60 und 80 Schlägen pro Minute angegeben werden (Proudman et al. 2006, Bishop et al. 2022). Eine Studie mit drei verschiedenen Kolikgruppen (chirurgisch, konservativ, euthanasiert) schlussfolgerte, dass die Herzfrequenzvariabilität möglicherweise wichtige

Informationen über das Stresslevel bei Kolikpatienten liefern und hilfreich für die Bewertung der Prognose sein könnte (Gehlen et al. 2020).

Bishop et al. untersuchte retrospektiv mehrere veröffentlichte Studien zu einzelnen Parametern und multivariablen Prognosemodellen. Der Colic Severity Score stellte sich als das sensibelste Modell, wenn auch wenig spezifisch, für die Vorhersage der Überlebenschance heraus. Dieser Score besteht aus nur vier Kategorien bzw. Parametern: Puls, Schleimhäute, Totalprotein aus der Bauchhöhlenflüssigkeit, sowie Laktat aus dem Blut (Furr et al. 1995, Bishop et al. 2022). Farbveränderungen der Maulschleimhaut, wie zum Beispiel blass oder zyanotisch, und die kapilläre Füllungszeit, insbesondere wenn diese mehr als drei Sekunden beträgt, sind sowohl in univariablen Analysen als auch in größeren Modellen von Bedeutung (Sutton et al. 2009, Wormstrand et al. 2014, Nikvand et al. 2019, Sutton et al. 2019, Bowden et al. 2020). Neben der Atemfrequenz wird die Bedeutsamkeit der Darmperistaltik immer wieder in der Literatur erwähnt, wobei die Abwesenheit der Darmmotorik als Hinweis auf eine schlechtere Prognose gewertet wird (Wormstrand et al. 2014, Nikvand et al. 2019, Farrell et al. 2021).

Proudman et al. evaluierte, dass prä-operative Schmerzen signifikant mit erhöhter Mortalität von chirurgischen Patienten korrelieren (Proudman et al. 2006).

In einer multivariablen Analyse beeinflusste der Body Condition Score den Ausgang von Koliken als einer der deutlichsten Parameter. Mit einem Body Condition Score von 4 bis 6 beziehungsweise von über 6 aus 9 wurde eine 2,83-beziehungsweise 3-fach höhere Wahrscheinlichkeit für eine post-operative Genesung assoziiert als mit einem Score von unter 4 aus 9 (Spadari et al. 2023).

Laborparameter

In Bezug auf die Laborwerte sind Laktat aus dem Blut sowie aus der Bauchhöhlenflüssigkeit als einzelne Prognoseparameter besonders repräsentativ (Grosche et al. 2006, Tennent-Brown 2012, Gehlen et al. 2020, Farrell et al. 2021, Smanik et al. 2022). In der Studie von Bishop et al. wurde der Grenzwert von 6 mmol/l Laktat im Blut als der sensitivste Einzelparameter für das Überleben der Patienten evaluiert (Bishop et al. 2022). Ein ansteigendes Laktat in der Bauchhöhlenflüssigkeit im Laufe der Erkrankung und ein Verhältnis von über 1:1 zwischen Laktat im Blut gegenüber der Bauchhöhle deuten auf ein ernsthaftes Leiden hin und resultieren in einer ungünstigen Prognose für die betroffenen

Patienten (Latson et al. 2005).

Neben Laktat wird ein erhöhter Hämatokrit bei Ankunft in der Klinik in Zusammenhang mit stärkeren Schmerzen und gesteigerter post-operativer Sterblichkeit gebracht. Für den Hämatokrit wird ab einem Grenzwert von 50 L/L die Wahrscheinlichkeit zum Überleben als deutlich geringer angegeben (Bishop et al. 2022). Eine Erhöhung von Totalprotein im Blut wird mit einer höheren Rate an post-operativen Wundheilungsstörungen verknüpft (Mair & Smith 2005, Proudman et al. 2006, Spadari et al. 2023).

Im Bauchpunktat spielen daneben die Farbe des Punktats und die Anzahl der Leukozyten eine entscheidende Rolle, um beispielsweise zu unterscheiden, ob der Dünn- oder Dickdarm eher obstruiert oder stranguliert ist. Bei einer Strangulation werden höhere Totalproteinwerte aufgrund von Ischämie, sowie steigende Leukozyten infolge von Apoptose und Nekrose erwartet (Grosche et al. 2006, Plummer 2009).

Einige als zuverlässig beschriebenen veröffentlichten Prognosemodelle sind speziell auf eine Population zugeschnitten und funktionieren in anderen Regionen weniger gut (Altman et al. 2009, Bishop et al. 2022).

2. Schmerz

2.1. Definition Schmerz

Die International Association for the Study of Pain definiert Schmerz bei Menschen als ein unangenehmes, sensorisches und emotionales Erlebnis, das mit einer tatsächlichen oder auch nur potenziellen Verletzung des Gewebes einhergeht oder diesem ähnelt (Raja et al. 2020). Diese Beschreibung lässt sich auf Tiere nur indirekt übertragen, da diese uns ihre Empfindungen nicht direkt mitteilen können. Durch das Studium des Verhaltens und der Reaktionen von Tieren auf noxische Reize kann man aber beim Tier von schmerzhaften Zuständen ähnlich wie bei Menschen ausgehen (Sann 2022).

Die Etymologie betrachtet, stammt das Wort Schmerz unter anderem vom lateinischen Wort *poena* ab, welches für Strafe oder Bestrafung steht. Des Weiteren beschreibt Schmerz eine persönliche und subjektive Erfahrung, welche von biologischen, psychologischen und sozialen Faktoren beeinflusst werden kann

(Raja et al. 2020). Aus evolutionärer Sicht ist es für alle Lebewesen bedeutend, potenziell schädigende Reize zu erkennen, um diese vermeiden oder minimieren zu können (Taylor et al. 2002). Besonders im Hinblick auf die dezenten Schmerzäußerungen des Pferdes ist es wichtig zu verstehen und zu beachten, dass die verbalen Äußerungen nur eine von mehreren Verhaltensweisen darstellen, um Schmerz auszudrücken (Zeitler-Feicht 2019, Raja et al. 2020).

Die Symptome des Pferdes bei Schmerzen hängen maßgeblich von der Lokalisation und der Intensität ab (Driessen et al. 2016). Speziell abdominale Schmerzen werden unter II.1.1. beschrieben. Akute, intensive Schmerzen können mit erhöhter Herz- und Atemfrequenz, steigendem Blutdruck, Schwitzen und trübem bis ängstlichem Gesichtsausdruck einhergehen (Sann 2022). Weitere Anzeichen können Unruhe, Senken des Kopfes, Aufblähen der Nüstern, eine angespannte Körperhaltung oder auch Lahmheit sein (Wagner 2010). Chronische Schmerzen sind dagegen bei Pferden weniger offensichtlich. Einige Tiere sind durch längerfristig verminderte Nahrungsaufnahme abgemagert und zeigen Verhaltensänderungen im Sinne von Apathie oder auch Aggression (Driessen et al. 2016, Sann 2022). Einen eindeutigen Indikator für Schmerz gibt es jedoch nicht und die Übereinstimmungen mit Anzeichen, die durch Stress ausgelöst werden, machen eine Abgrenzung voneinander schwierig (Sann 2022).

2.2. Physiologie der Nozizeption

Raja et al. beschreibt, dass Schmerz und Nozizeption unterschiedliche Phänomene sind, da Schmerz im Gegensatz zur Nozizeption nicht nur allein aus der Aktivität der sensorischen Neurone abgeleitet werden kann (Raja et al. 2020). Vielmehr bezeichnet die Nozizeption den Prozess der Schmerzwahrnehmung über Nozizeptoren und die Weiterleitung des schmerzhaften Reizes (Hector & Mama 2018). Thermische, chemische oder mechanische Stimuli können potenziell gewebeschädigend sein und verschiedene periphere Nozizeptoren reagieren mit nozizeptiven Impulsen. Diesen Vorgang nennt man Nozizeption oder auch Transduktion (Driessen et al. 2016). Die Nozizeptoren befinden sich an den distalen Enden von afferenten Nervenfasern, deren Zellkörper in den Spinalganglien liegen (Hector & Mama 2018).

Im peripheren Nervensystem kommen hauptsächlich drei verschiedene Gruppen von sensiblen Nervenfasern vor: (1) A β -Fasern sind hoch myelinisiert und haben

eine niedrige Reizschwelle, demzufolge können sie Aktionspotenziale schnell von peripher nach zentral leiten und reagieren schon bei leichten Berührungen, sie sind für die Vermittlung von taktilen Informationen zuständig; (2) dünn myelinisierte A δ -Fasern, welche Signale etwas langsamer als A β -Fasern und erst bei stärkeren mechanischen und thermischen Noxen weitergeben; (3) unmyelinisierte C-Fasern, die als polymodale Nozizeptoren sowohl auf mechanische, thermische als auch auf chemische Stimuli reagieren können, jedoch die höchste Reizschwelle besitzen (Erlanger & Gasser 1930, D'Mello & Dickenson 2008, Sann 2022). Die beiden letztgenannten Fasertypen werden daher als Schmerzfasern bezeichnet. Während mechanische und thermische Reize von extern einwirken, entstehen chemische Noxen im Körper selbst, wenn beispielsweise durch Entzündung Elektrolyte und chemische Mediatoren ins Gewebe ausgeschüttet werden (D'Mello & Dickenson 2008). Sogenannte schlafende Nozizeptoren sind unter physiologischen Bedingungen nicht erregbar, sondern werden erst durch krankhafte Zustände sensibilisiert. Zum Beispiel kann es in Folge einer Läsion im Gewebe zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren kommen, welche die Nozizeptoren über spezifische Rezeptoren aktivieren. Diese schlafenden Nozizeptoren befinden sich in Muskeln, Gelenken und fast allen Organen des Körpers mit Ausnahme des zentralen Nervensystems (Sann 2022).

Neben dem klassischen Neurotransmitter Glutamat enthalten viele Nozizeptoren noch andere Neuropeptide wie SP, Neuropeptid A oder das Calcitonin Gene-Related Peptide. Diese Neuropeptide können bei Aktivierung der Nozizeptoren nicht nur im Bereich der zentralen Synapse am Rückenmark, sondern außerdem am efferenten Ende der Nervenfasern freigesetzt werden und lokale Entzündungsreaktionen verursachen. Der Begriff der neurogenen Entzündung beinhaltet lokale Vasodilatation und Hyperämie sowie Plasmaextravasation und Granulozyteninfiltration (Steinhoff et al. 2014).

Über die primären afferenten Nervenfasern werden die Impulse zum Rückenmark geleitet, was als Transmission bezeichnet wird (Driessen et al. 2016). Anschließend werden die Informationen neurochemisch auf die sekundären Afferenzen im Dorsalhorn übertragen. Im Zuge dessen kommt es zur Modulation, also zur Modifizierung der Signaltransmission (Driessen et al. 2016). Die Signale werden im Tractus spinothalamicus zum Thalamus und weiter im Tractus spinoreticularis zum Hirnstamm übertragen (Hector & Mama 2018). Die nozizeptiven Fasern des

Thalamus enden am Rand des ventrobasalen Komplexes, sowie in nicht spezifischen Kerngebieten, die ihrerseits mit Bereichen des Kortex verbunden sind. Im somatosensorischen Kortex werden die Reize erkannt und lokalisiert (Sann 2022). Die Perzeption, also die reine sinnliche Wahrnehmung des Schmerzes, findet statt (Driessen et al. 2016). Als Reaktion darauf werden motorische und vegetative Komponenten aktiviert. Über absteigende motorische Nervenbahnen werden Motoneurone angesprochen, welche zum Beispiel im Wegziehen der Gliedmaße resultieren können (Sann 2022). Neuroendokrine (durch Cortisol und Katecholamine), metabolische (in Form von Hyperglykämie) und physiologische (Erhöhung der Herz- und Atemfrequenz) Antworten können vegetativ über die efferenten Bahnen zu den präganglionären Neuronen im Rückenmark ausgelöst werden (Hector & Mama 2018).

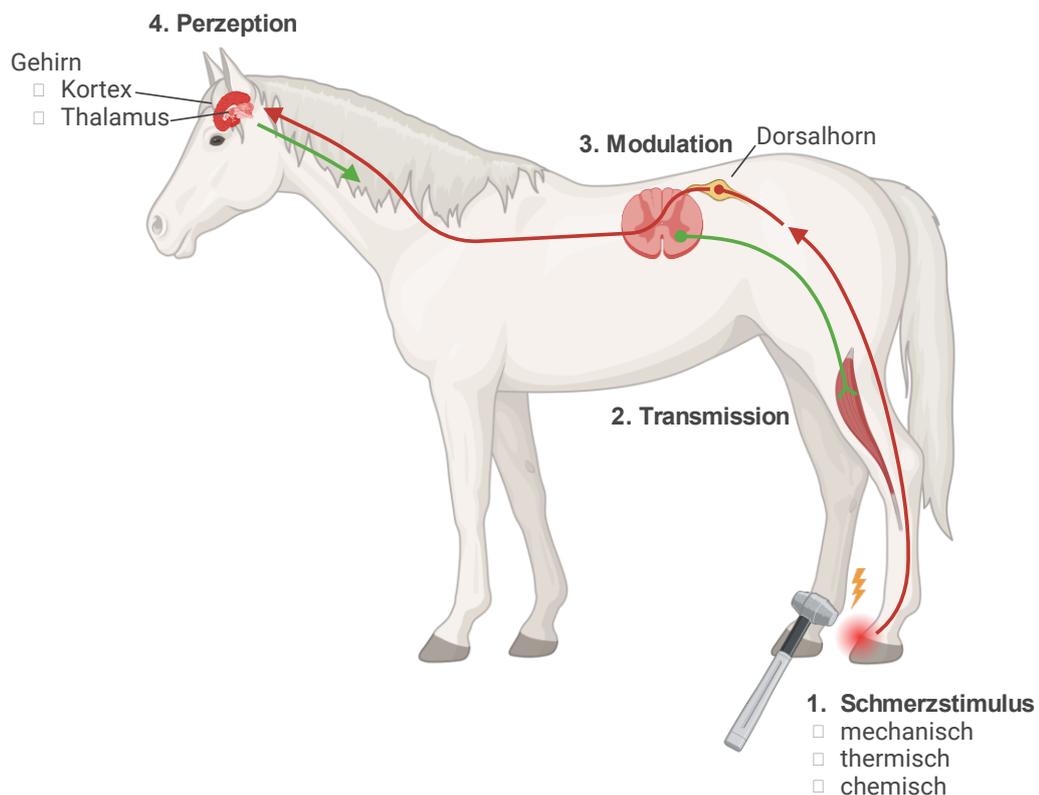


Abbildung 1: Schmerzweiterleitung (erstellt mit BioRender.com).

2.3. Methoden zur objektiven Schmerzeinschätzung

Pferde sind ursprünglich potenzielle Beute von Raubtieren und maskieren daher ihre Schmerzen, um nicht als leichtes Ziel erkannt zu werden (Taylor et al. 2002). Außerdem besitzen sie als Besonderheit keinen spezifischen Schmerzlaut (Zeitler-Feicht 2019). Daneben kann die unterschiedliche Bewältigung von Stress und Angst, sowie das Temperament des Tieres die individuelle Schmerzwahrnehmung beeinflussen. Aus diesen Gründen sind das Erkennen und das richtige Einschätzen von Schmerzen bei Pferden besonders anspruchsvoll. Daher kann es vorkommen, dass ungewöhnliches Verhalten und Symptome am besten von den Pferdebesitzern selbst oder den Trainern eingeschätzt werden können, die das individuelle Pferd gut kennen (Wagner 2010).

Infolgedessen wurden in den letzten Jahren immer mehr objektive Messmethoden zur Schmerzevaluierung entwickelt, um die Therapie an den jeweiligen Patienten adäquat anpassen und den Krankheitsverlauf besser einschätzen zu können (Ashley et al. 2005, de Grauw & van Loon 2016, Sellon et al. 2022). In klinischen Studien wurden sowohl einzelne als auch die Kombination aus mehreren Parametern untersucht. Die meisten Schmerzskaleten sind nicht universell einsetzbar, sondern konzentrieren sich auf bestimmte Arten von Schmerzen, wie sie beispielsweise bei orthopädischen Problemen oder post-operativen Schmerzen nach elektiven Eingriffen wie Kastrationen auftreten können (Dalla Costa et al. 2014, de Grauw et al. 2014, de Grauw & van Loon 2016). Im Folgenden werden Methoden und Parameter beschrieben, welche zur Bewertung von prä- und postoperativen abdominalen Schmerzen hilfreich sein können.

Physiologische Parameter

Die Herz- und Atemfrequenz sind leicht messbare Parameter, die unter Schmerzen ansteigen können (Pritchett et al. 2003, de Grauw & van Loon 2016, Hernández-Avalos et al. 2021, Sann 2022). Auch wenn die Stärke von Schmerzen bisher nicht sicher mit der absoluten Höhe der Herzfrequenz assoziiert werden konnte, sinkt die Herzfrequenz bei schmerzhaften Erkrankungen nach Schmerzmittelgabe (Dzikiti et al. 2003, Rietmann et al. 2004). In einer Studie mit verschiedenen Kolikgraden zeigte sich, dass konservative, überlebende Kolikpatienten signifikant niedrigere Herzfrequenzen aufwiesen als Patienten, die aufgrund der Schwere ihrer Erkrankung euthanasiert werden mussten (Gehlen et al. 2020). Pritchett et al.

evaluierten, dass eine erhöhte Herzfrequenz nach abdominalen Eingriffen, insbesondere nach Kolikoperationen, als Indikator für Schmerzen eingesetzt werden kann (Pritchett et al. 2003).

Die Herz- und Atemfrequenz sind jedoch auch Teil der physiologischen Stressreaktion und können ebenso aus anderen Gründen, beispielsweise durch Aufregung oder Erkrankung des Herz-Kreislauf-Systems, ansteigen. Folglich stellen sie daher keine schmerzspezifischen Parameter dar (Taylor et al. 2002, de Grauw & van Loon 2016). Die Herzfrequenz kann daher nur ergänzend zu anderen, vor allem verhaltensbasierten Skalen, eingesetzt werden (Ashley et al. 2005).

Endokrine Parameter: Hormone und Mediatoren

Ausgeprägte Koliksymptome, die Anzeichen von erheblichen Schmerzen sind, wurden signifikant mit höheren Cortisolwerten verknüpft (Mair et al. 2014). Im Verlauf der Behandlung von Kolikpatienten sanken die Cortisolwerte nur bei Pferden ab, die überlebten, nicht aber bei Pferden, die euthanasiert wurden mussten. Gehlen et al. vermuten daher eine Verbindung zwischen höheren Cortisolspiegeln und schmerzhaften Zuständen (Gehlen et al. 2020). Darüber hinaus könnte Cortisol auch als post-operativer Marker hilfreich sein, um Schmerzen zu graduieren (Pritchett et al. 2003).

Andere endokrine Biomarker wie β -Endorphin und die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin wurden bei verschiedenen Schmerzzuständen getestet, sind aber ebenso wie Cortisol Teil der physiologischen Stressreaktion und haben daher als alleinige Schmerzparameter keinen Bestand (Raekallio et al. 1997, de Grauw & van Loon 2016, Hector & Mama 2018).

Auf der Mimik basierende Modelle

Auf Basis des Gesichtsausdrucks wurde die Horse Grimace Scale (HGS) zur Bewertung von Schmerzen anhand einer Studie mit Kastraten entwickelt und hat sich inzwischen in mehreren Untersuchungen mit hoher Evidenz bewiesen (Dalla Costa et al. 2014, Dalla Costa et al. 2016, Evangelista et al. 2022). Die HGS bewertet sechs verschiedene Gesichtsregionen: (1) die Stellung der Ohren, (2) die Anspannung der Augenlider bzw. der Öffnungsgrad der Augen, (3) die Anspannung der Muskeln über der Augenpartie, (4) die Anspannung und das Hervortreten der Kaumuskulatur, (5) die Anspannung des Mauls und das

Hervortreten des Kinns, (6) die Anspannung der Nüstern und die Abflachung des Nasenprofils. Sie dazu Tabelle 1.

Das Schmerzgesicht von Pferden wurde daneben von einer anderen Forschungsgruppe unter Verwendung von zwei experimentellen nozizeptiven Reizen untersucht (Gleerup et al. 2015). Es konnten ähnliche Gesichtsmerkmale mit Schmerz verbunden werden: angelegte oder asymmetrische Ohren, ein gewinkeltes Erscheinen der Augenpartie, gesenkter oder starrer Blick, medio-lateral erweiterte Nüstern und Anspannung im Bereich der Lippen, des Kinns und anderer mimischer Muskulatur.

Die Equine Utrecht University Scale for Facial Assessment of Pain (EQUUS-FAP) wurde entgegen den anderen mimischen Skalen direkt zur Bewertung von akuten viszeralen Schmerzen bei Pferden konstruiert und in einer Folgestudie validiert (van Loon & van Dierendonck 2015, van Dierendonck & van Loon 2016). Die Bewegungen des Kopfes, die Öffnung der Augen, das Verhalten im Sinne von Aufmerksamkeit, die Öffnung der Nüstern, die Anspannung des Mauls und der Lippen, der Muskeltonus am Kopf, Flehmen und Gähnen, Zähneknirschen, sowie die Position der Ohren werden bewertet. Inzwischen hat sich die EQUUS-FAP auch als hilfreich für post-operative Schmerzen im Bereich des Kopfes erwiesen (van Loon & van Dierendonck 2017).

Vorteile dieser Skalen sind, dass sie einerseits leicht zu erlernen und andererseits einfach und schnell durchführbar sind. Außerdem zeigten sie in Studien wiederholt präzise und reproduzierbare Ergebnisse (de Grauw & van Loon 2016, van Loon & van Dierendonck 2018).

Starr nach hinten gerichtete Ohren	Öffnungsgrad der Augen	Anspannung oberhalb der Augenpartie
		
<p>Die Ohren werden starr nach hinten gedreht. Der Abstand zwischen den Ohren kann dadurch weiter erscheinen.</p>	<p>Das Augenlid ist teilweise oder vollständig geschlossen. Wenn das Auge mehr als zur Hälfte geschlossen wird, sollte dies als 2 gewertet werden.</p>	<p>Die Kontraktion der Muskeln oberhalb des Auges bewirkt eine Sichtbarkeit der darunter liegenden Knochen. Wenn die Schläfe deutlich sichtbar ist, sollte dies als 2 gewertet werden.</p>
Anspannung der Kaumuskeln	Anspannung des Mauls und Hervortreten des Kinns	Anspannung der Nüstern und Abflachung des Nasenprofils
		
<p>Angespannte Kaumuskeln sind als erhöhte Spannung oberhalb des Mauls erkennbar. Wenn die Kaumuskeln deutlich hervortreten, sollte dies als 2 gewertet werden.</p>	<p>Die Anspannung des Mauls ist durch eine zurückgezogene Oberlippe und ein durch die angespannte Unterlippe ausgeprägtes Kinn sichtbar.</p>	<p>Die Nüstern sind angespannt und leicht geweitet, das Profil der Nase wird flacher und die Lippen werden länger.</p>

Tabelle 1: Bilder von Pferden mit Schmerzgesicht, eingeteilt nach der Horse Grimace Scale (Dalla Costa et al. 2014). Jeder Einzelparameter kann als 0 (not present), 1 (moderately present) oder 2 (obviously present) bewertet werden.

Verhaltensbasierte Schmerzskalen für abdominale Schmerzen

Zwei limitierende Faktoren sind für die Bewertung anhand des Verhaltens in klinischen Studien und in der Praxis bedeutsam. Da die Pferde bereits in einem schmerzhaften Zustand vorgestellt und beurteilt werden, sind den untersuchenden Personen die üblichen Verhaltensweisen der Pferde nicht bekannt. Hinzukommend werden die Patienten meist in einer Tierklinik untersucht, was für die sensiblen Tiere eine ungewohnte Umgebung darstellt. Aufgrund dessen könnten manche Verhaltensweisen schwierig zu bewerten sein (de Grauw & van Loon 2016).

Sutton et al. entwickelte und validierte zwei auf Verhalten basierende Schmerzskalen für Pferde mit akuter Kolik: die Equine Acute Abdominal Pain Scale-1 (EAAPS-1,) und -2 (EAAPS-2) (Sutton et al. 2013). Die EAAPS-1 hat sich als das zuverlässigere Modell erwiesen und wurde 2019 überarbeitet und erneut validiert. Die aktuelle Version wird nun als EAAPS bezeichnet (Sutton & Bar 2016). Sie beinhaltet fünf verschiedene Stufen von gering- bis zu hochgradigen Koliksymptomen. Ein Score von 1 wird durch „Flehmen“ und „zur Flanke umschauen“, ein Score von 2 durch „Brust-Bauch-Lage“, „Strecken“ und „allgemeine Unruhe“ erreicht. Der Score von 3 wird durch die Symptome „zum Abdomen treten“ und „Scharren“ beschrieben. Die hochgradigen Scores von 4 und 5 werden bei „Hinlege-Versuchen“ und „Seitenlage“, beziehungsweise bei „Wälzen“ und „Rückenlage“ vergeben. Die EAAPS wurde in Folgestudien der Autoren als überwiegend schnell und einfach durchführbar bewertet (Sutton et al. 2019, Maskato et al. 2020).

	Verhalten	Score
Ggr.	Zur Flanke umschauen, Flehmen	1
↓	Brust-Bauch-Lage, Strecken, allgemeine Unruhe	2
↓	Zum Abdomen treten, Scharren	3
↓	Hinlege-Versuche, Seitenlage	4
Hgr.	Rückenlage, Wälzen	5

Tabelle 2: Schmerzskala mit gering- bis hochgradigen Koliksymptomen nach der Equine Acute Abdominal Pain Scale (Sutton & L. 2016).

Kombinierte Modelle

Um den vorhandenen Schmerzgrad möglichst zuverlässig zu evaluieren, gibt es auch kombinierte Modelle, die verschiedene Parameter (beispielsweise Mimik, Verhalten, physiologische Parameter, sowie Laborwerte) einbeziehen. Die Equine Utrecht University Scale for Composite Pain Assessment (EQUUS-COMPASS) beinhaltet vier physiologische Parameter (Herzfrequenz, Atemfrequenz, Körpertemperatur, Darmmotilität), sowie zehn Verhaltensparameter (Haltung, Schwitzen, Schweifschlagen, Scharren, etc.) (van Loon & van Dierendonck 2015, van Dierendonck & van Loon 2016). Um kombinierte Modelle zu prüfen, wurden bereits mehrere Untersuchungen zu Schmerzen nach Kolikoperationen durchgeführt. Pritchett et al. stellten fest, dass die Kombination aus verminderter Fortbewegung, erhöhter Plasma-Cortisol-Konzentration und erhöhter Herzfrequenz potenzielle Indikatoren für post-operative Schmerzen darstellen (Pritchett et al. 2003). Eine multi-dimensionale Skala, die Post Abdominal Surgery Pain Assessment Scale (PASPAS) auf der Basis von physiologischen Parametern (Herz- und Atemfrequenz) und sieben Verhaltensparametern, wurde ebenfalls als nützliche Methode zur Graduierung von schmerzhaften Zuständen nach Laparotomien vorgestellt (Graubner et al. 2011). Die Composite Pain Scale (CPS) von Bussi eres et al., eine multifaktorielle numerische Skala mit 13 Parametern, wurde urspr unglich f ur akute orthop adische Schmerzen entwickelt (Bussi eres et al. 2008). Van Loon et al. wendeten die CPS auf post-operative Kolikpatienten an und stellten eine gute objektive Schmerzbewertung und eine signifikante Korrelation zum  berleben der Patienten fest. Es werden physiologische Parametern und das Verhalten der Patienten miteinbezogen (van Loon et al. 2014).

Zusammenfassend gibt es einige Schmerzindikatoren, die nicht spezifisch auf Schmerz hinweisen, sowie Schmerzskalen, die auf Verhalten und Mimik basieren. Die auf dem Gesichtsausdruck basierenden Skalen sind am besten geeignet, um in den praktischen Alltag integriert zu werden. Die kombinierten Modelle zeigen ebenfalls vielversprechende Ergebnisse, erfordern jedoch mehr Zeit bei der Anwendung (van Loon & van Dierendonck 2018).

3. In dieser Studie untersuchte Stress- und Schmerzparameter

3.1. Cortisol

Aufbau & Vorkommen von Cortisol

Die Hormone aus der Nebennierenrinde werden als Kortikoide, unterteilt in Glukokortikoide und Mineralokortikoide, bezeichnet. Das Glukokortikoid Cortisol gilt als das Stresshormon und wird demnach bei Belastung des Körpers vermehrt gebildet (Bamberger et al. 1996). Stress wurde als erstes 1936 von Selye als Antwort auf verschiedene Noxen, wie zum Beispiel Kälte, chirurgische Verletzungen, spinaler Schock oder hohe Dosen einer Vielzahl von Medikamenten beschrieben (Selye 1998). Seitdem wurde die Forschung zu den Auswirkungen von Stress auf den Körper intensiv vorangetrieben.

Cortisol wurde erstmals in den späten 1940er-Jahren von Kendall und Reichstein aus der Nebennierenrinde isoliert. Sie beobachteten eine suppressive Wirkung auf die Organe des Immunsystems. Die antiinflammatorische Wirksamkeit von Cortisol wurde kurze Zeit später durch die Gabe an Patienten mit rheumatoider Arthritis durch den Rheumatologen Hench bewiesen (Ward et al. 1951, Chrousos 1995, Barnes 2014). Die Freisetzung von Cortisol erfolgt hauptsächlich durch Stimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse). Die HPA-Achse spielt eine zentrale Rolle in der Steuerung der Körperhomöostase durch Beeinflussung vieler Organ- und Gewebefunktionen. Vermehrter Stress bewirkt durch die Bildung des Corticotropin-Releasing-Hormons im Hypothalamus die Freisetzung des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH) aus dem Hypophysenvorderlappen. ACTH regt wiederum die Nebennierenrinde an und resultiert damit in der Ausschüttung von Cortisol ins Blut (Chrousos 1995, Newton 2000, Miller 2018). Cortisol ist ein fettlösliches Molekül und kann daher nach Freisetzung am Gehirn regulierend, insbesondere auf Hypothalamus und Hypophyse, wirken. Die HPA-Achse unterliegt unter anderem durch SP und auch ACTH einem negativen Feedback-Mechanismus (Harbuz & Lightman 1992, Evans et al. 2013, Iftikhar et al. 2020).

Im Blut wird Cortisol zu den Zielorganen transportiert, wo es zahlreiche Stoffwechseleffekte auslöst. Durch die proteinkatabole Wirkung kommt es zur

Mobilisierung von Aminosäuren. Insgesamt wird die Glukoneogenese stimuliert, wodurch ein Anstieg des Blutglukosespiegels, sowie die Glykogenbildung in der Leber angeregt werden. Gleichzeitig wird die Fettsäuresynthese in der Leber gehemmt. Als Folge der verminderten Proteinbiosynthese werden weniger entzündungsfördernde Substanzen gebildet, wodurch die entzündungshemmende Wirkung der Glukokortikoide entsteht. Bei längerem Einfluss von biologischem oder synthetischem Cortisol kommt es zu einer verminderten Antikörperproduktion und folglich zur immunsuppressiven Wirkung (Newton 2000, Schröder & Rummel 2022).

Glukokortikoide werden durch den Glukokortikoid-Rezeptor mediiert, welcher zur Familie der Steroidhormonrezeptoren gehört. Diese Rezeptoren sind eine Superfamilie der ligandenabhängigen Transkriptionsfaktoren und kontrollieren eine Vielzahl von physiologischen Funktionen. Der ungebundene Glukokortikoid-Rezeptor ist überwiegend im Zytoplasma lokalisiert, wandert aber nach der Hormonbindung schnell über einen intrazellulären Signalweg zum Zellkern. Der aktivierte Glukokortikoid-Rezeptor kann hier mit speziellen DNA-Sequenzen interagieren und so die Transkription bestimmter, besonders an der Regulierung des Stoffwechsels beteiligter Gene, beeinflussen (Galigniana et al. 1998, Heitzer et al. 2007).

Funktionen von Cortisol

Als Biomarker für Stress wird Cortisol zum Beispiel auch bei Forschungen eingesetzt, die den Tierschutz betreffen. In einer Studie zur Benutzung sogenannter Aufsatzzügel (Hilfszügel, welche vom Gebiss über das Genick bis zum Widerrist verschnallt werden, um eine höhere Kopfhaltung des Pferdes zu bewirken) wurde deren Effekt auf Stressparameter untersucht. Es zeigte sich, dass Pferde mit hoch eingestellter, also unnatürlicherer Kopf-Hals-Haltung signifikant höhere Cortisolwerte erreichten als die mit einer niedrigeren (ähnlich einer natürlichen Haltung) oder die ohne Hilfszügel (Bennett-Wimbush et al. 2020). Scholler et al. analysierten in einem vierstufigen Stressmodell unter anderem Cortisol und Substanz P (SP). Hier zeigten Pferde mit steigendem Stresslevel einen linearen Anstieg des Serum-Cortisols (Scholler et al. 2023). Im Vergleich dazu korrelierten die Speichel-Cortisolwerte kaum mit dem Stressmodell (Scholler 2023). Um Auswirkungen wie Schmerz, Stress oder Entzündung von an Hufen angebrachten Gewichten und Ketten beim Training von Tennessee Walking Horses zu evaluieren,

wurden in einer fünftägigen Studie ebenfalls Cortisol, SP und Fibrinogen gemessen. Die biochemischen Parameter zeigten keine signifikanten Veränderungen, es änderte sich lediglich das Liegeverhalten der Pferde in beiden Gruppen. Die Autoren vermuten einen größeren Stressfaktor durch die Umstellung in die neue Umgebung zum Zwecke der Studie, als durch die angebrachten Vorrichtungen an sich, da die Cortisolwerte in der Zeit nach der Umstellung und vor den Behandlungen am höchsten waren (Everett et al. 2018).

Auch pathophysiologisch ist Cortisol ein wichtiger Biomarker in zahlreichen Studien. Grundsätzlich haben kranke Pferde höhere Cortisolwerte als klinisch gesunde Pferde (Hoffsis & Murdick 1970). In einer Studie über trächtige Stuten mit Kolik und Uterustorsionen wurde festgestellt, dass die erkrankten und damit gestressten Tiere im Vergleich zu den gesunden Pferden ein erhöhtes Cortisol aufwiesen. Auch Stuten, welche anschließend abortierten, hatten höhere Werte als Stuten ohne Abort (Santschi et al. 1991).

Hinchcliff et al. veröffentlichten eine Untersuchung mit Pferden, die wegen Kolik in eine Klinik eingeliefert wurden. Den Patienten wurde innerhalb von 30 Minuten nach Einlieferung Blut für die Bestimmung der Serum-Cortisol-Konzentration abgenommen. Sie stellten fest, dass die Pferde, die nicht überlebten, im Vergleich zu denjenigen, die aus der Klinik entlassen werden konnten, signifikant erhöhte Cortisolwerte aufwiesen (Hinchcliff et al. 2005). Der genaue pathophysiologische Zusammenhang zur Erhöhung von Cortisol bei Kolik kann bisher nicht sicher erklärt werden. Es wird jedoch vermutet, dass die durch die Kolik ausgelösten Schmerzen an der Steigerung von Serum-Cortisol beteiligt sind. In der Studie von Mair et al. wurden Kolikpatienten in drei Grade (gering-, mittel- und hochgradig) eingeteilt und deren Serum-Cortisol-Konzentrationen untereinander verglichen (Mair et al. 2014). Pferde mit Koliksymptomen hatten dann höhere Cortisolwerte, wenn sie auch eine erhöhte Herzfrequenz von über 45 Schlägen pro Minute hatten. Außerdem hatten Pferde mit mittel- und hochgradiger Koliksymptomatik signifikant höhere Werte als geringgradige Koliker. Insgesamt korrelierten erhöhte Serum-Cortisolwerte mit der Schwere der Kolik und auch mit einem gesteigerten Sterberisiko (Mair et al. 2014). Die Variabilität der Herzfrequenz gilt als ein etablierter Indikator für Stress (Mohr et al. 2000). Gehlen et al. stellten eine positive Korrelation zwischen Cortisol und der Herzfrequenzvariabilität bei Kolikpatienten fest (Gehlen et al. 2020). Eine weitere Forschungsgruppe analysierte neben einigen

anderen Parametern auch Serum-Cortisol bei Pferden mit verschiedenen Krankheiten. Neben akuten Erkrankungen wie Trauma, Myositis oder Arthritis konnten bei Pferden mit akutem Abdomen die höchsten Cortisol-Konzentrationen gemessen werden. Insbesondere verzeichneten Pferde mit Strangulationen im Dünn- oder Dickdarmbereich die höchsten und weniger schwer erkrankte Pferde, zum Beispiel mit einer Verlagerung des Kolons, niedrigere Cortisolwerte (Ayala et al. 2012). In einer Pilotstudie wurde Speichel-Cortisol als ein durch Schmerz induzierter Biomarker für Stress bei Pferden mit akutem Abdomen analysiert. Außerdem wurden weitere Marker wie Alpha Amylase (AA) aus dem Speichel als Biomarker für Aktivität im sympathischen Nervensystem, aber auch Serum-Amyloid A und Plasma-Laktat gemessen. Zum Vergleich bestimmten Contreras-Aguilar et al. auch klinische Parameter: die Herz- und Atemfrequenz, die EAAPS-1 (beschrieben unter II.2.3.) und den Systemic Inflammatory Response Syndrome Score. Die Pferde mit akutem Abdomen zeigten signifikant höhere Speichel-Cortisolwerte und Speichel-Alpha-Amylase-Aktivität (Speichel-AA). Speichel-AA und EAAPS-1 korrelierten in dieser Studie miteinander, die anderen Biomarker wiesen keinen Zusammenhang mit den klinischen Parametern auf (Contreras-Aguilar et al. 2018).

Methodik & Werte von Cortisol

Cortisol kann im Blut und im Speichel gemessen werden, wobei zwischen beidem in der Literatur keine konstante lineare Korrelation dargestellt werden kann. Bohák et al. evaluierten einen schwachen Zusammenhang, während in anderen Studien gar keine Korrelation messbar war (Hellhammer et al. 2009, Bohák et al. 2013, Kędzierski et al. 2013). In einer Folgestudie von Kędzierski et al. zu Arabern beim Rennttraining konnte eine Korrelation mit 30-minütigem Abstand analysiert werden. Die direkt nach dem Training gemessenen Blutwerte standen in Zusammenhang mit den Speichelwerten nach 30 Minuten Erholungsphase. Beides konnte weitere 30 Minuten später erneut reproduziert werden (Kędzierski et al. 2014). Da das Cortisol nach Aktivierung der HPA-Achse zunächst in den Kreislauf und anschließend passiv in die Speichelflüssigkeit diffundieren muss, ist dadurch eine mögliche Zeitversetzung zwischen der Speichel- und Blutantwort auf Stress denkbar (Granger et al. 2007). Viele Faktoren wie zum Beispiel die Halbwertszeit von Cortisol im Blut oder der zirkadiane Rhythmus können die Cortisol-Messungen beeinflussen. Insbesondere die teilweise Bindung von Cortisol an das Cortisol-

bindende Globulin und die enzymatische Umwandlung zu Cortison im Speichel können niedrigere Speichel- als Blutwerte erklären (Hellhammer et al. 2009).

In mehreren Studien wurde der zirkadiane Rhythmus von Cortisol bei Pferden bestätigt (Cordero et al. 2012, Bohák et al. 2013, Contreras-Aguilar et al. 2020). Bohák et al. nahmen Speichel- und Serumproben von gesunden Pferden. In einem 24-Stunden Profil der mittleren Speichel- und Serumkonzentrationen wurde dargestellt, dass die höchsten Werte jeweils um 10.00 Uhr beziehungsweise um 10.50 Uhr am Vormittag und dementsprechend die niedrigsten circa zehn bis zwölf Stunden später erreicht wurden (Bohák et al. 2013). In einer anderen Studie waren die Höchstwerte sowohl im Frühjahr als auch im Herbst zwischen 6.00 und 7.00 Uhr (Cordero et al. 2012). Beim Menschen ist bekannt, dass im Alter die durchschnittlichen Cortisol-Konzentrationen zwar höher sind, sich jedoch die Amplitude des täglichen Rhythmus verringert (Touitou & Haus 2000). Auch bei Hunden ist das Alter mit einer abgeschwächten Amplitude oder sogar einem Verlust der zirkadianen Rhythmik des Cortisols verbunden (Palazzolo & Quadri 1987). Cordero et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen bei Pferden. Sie evaluierten, dass das Alter zwar nicht den zirkadianen Rhythmus der Tiere ausschaltet, jedoch die Variabilität der Cortisol-Konzentrationen. Es wird vermutet, dass diese verringerte Variabilität auf eine verminderte Reaktionsfähigkeit der Nebennieren mit zunehmendem Alter zurückzuführen sein könnte (Cordero et al. 2012).

Ohne eine deutliche Veränderung der Amplitude oder der Akrophase (der Maximalwert eines Zyklus) war der Serum-Mittelwert über eine Periodendauer (Midline Estimating Statistics of Rhythm, MESOR) im Mai signifikant höher als im September. Da Cortisol eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel und bei Stressreaktionen spielt, wird vermutet, dass diese jahreszeitlichen Schwankungen mit der Änderung der Nahrungsverfügbarkeit und des Energiebedarfs, welche in den Herbst- und Wintermonaten auftreten, verbunden sein könnten (Cordero et al. 2012). Es ist bekannt, dass die Cortisol-Konzentration bei Pferden als Reaktion auf anspruchsvolle Umweltbedingungen wie übermäßige Hitze, Kälte oder Feuchtigkeit schwanken kann (Williams et al. 2002).

Serum-Cortisolwerte	Speichel-Cortisolwerte
34,7 ± 5,7 nmol/ (Ayala et al. 2012)	Tagesdurchschnitt: 0,13 µg/dl = 3,61 nmol/l (Marjan & Prišenk 2017)
97,7 ± 21,2 nmol/l (Bennett-Wimbush et al. 2020)	Morgens: 0,45 ± 0,57 nmol/dm ³ = 0,45 ± 0,57 nmol/l (Strzelec et al. 2011)
0,5 – 2,0 µg/dl = 13,79 – 55,17 nmol/l (Hinchcliff et al. 2005)	Abends: 0,49 ± 0,74 nmol/dm ³ = 0,49 ± 0,74 nmol/l (Strzelec et al. 2011)
MESOR: 22,67 ng/ml = 62,57 nmol/l mit einer Amplitude von 11,93 ng/ml = 32,93 nmol/l (Bohák et al. 2013)	MESOR: 0,52 ng/ml = 1,44 nmol/l mit einer Amplitude von 0,12 ng/ml = 0,33 nmol/l (Bohák et al. 2013)

Tabelle 3: Physiologische Serum- und Speichel-Cortisolwerte von Pferden aus angegebenen Literaturangaben.

3.2. Substanz P

Aufbau & Vorkommen von Substanz P

Erstmals wurde die Substanz P (SP) im Jahre 1931 von v. Euler und Gaddum, isoliert unter anderem aus Gehirn und Darm von Hasen und Pferden, beschrieben. Sie beobachteten einerseits periphere Vasodilatation, andererseits gesteigerte Peristaltik am Dünndarm durch den Einfluss der damals noch unbekanntem SP (v. Euler & Gaddum 1931). Gaddum und Schild benannten die Substanz in Bezug auf das Puder (P wie *powder*), welches sie nach der Extraktion erhielten (Gaddum & Schild 1934).

Substanz P ist ein Undecapeptid, also ein Oligopeptid, welches aus einer Kette von elf Aminosäuren aufgebaut ist: Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-MetNH₂ (Chang & Leeman 1970). Es gehört unter anderen neben Neuropeptid A (NKA) und Neuropeptid B (NKB) zur Familie der Tachykinine oder auch Neurokinine, und wird durch das TAC1 Gen codiert (Pennefather et al. 2004, Steinhoff et al. 2014). Die Synthese des Neurotransmitters SP erfolgt vor allem in C-Fasern des zentralen und peripheren Nervensystems (ZNS bzw. PNS). C-Fasern sind unmyelinisiert und haben daher eine langsamere Reizweiterleitung als myelinisierte A- und B-Fasern (s. Abschnitt II.2.2.). Sie kommen vor allem im autonomen Nervensystem, sowie im Dorsalhorn und Dorsalwurzelganglion des Rückenmarks vor (Lembeck 1953, Otsuka et al. 1976, Hunt & Mantyh 2001). Sie

leiten hauptsächlich sensorische Informationen weiter und spielen daher auch eine Rolle in der Schmerzweiterleitung (Harmar et al. 1980, Hunt & Mantyh 2001). Während der Synthese von NKA entsteht auch immer SP, wobei SP auch allein synthetisiert werden kann (Pennefather et al. 2004). Anschließend wird das Neuropeptid SP in Vesikel verpackt, axonal zu den Nervenendigungen transportiert und gespeichert. Studien zufolge ist die Konzentration von SP in der grauen Substanz des ZNS höher als in der weißen (Ebner & Singewald 2006). Viele Nervenzellen und -fasern in verschiedenen Bereichen des ZNS und PNS erwiesen sich als immunreaktiv für SP (Douglas et al. 1982, Ribeiro-da-Silva & Hökfelt 2000). SP kommt neben dem ZNS und PNS auch in vielen anderen Geweben von Säugetieren vor: im enterischen Nervensystem und im kardiovaskulären System, aber auch in nicht-neuronalen Zellen wie endothelialen Zellen, Knochenmarkstammzellen und Entzündungszellen (Holmgren & Jensen 2001, Pennefather et al. 2004, Suvas 2017, Redkiewicz 2022). SP wird hauptsächlich durch den G-Protein-gekoppelten Rezeptor Neurokinin-1 (NK1-Rezeptor) mediiert und ist der Ligand mit der höchsten Affinität für diesen Rezeptor. An diesem Rezeptor können aber auch andere Neuropeptide wie zum Beispiel NKA binden (Mistrova et al. 2016).

Funktionen von Substanz P

Im Gegensatz zu Cortisol hat SP vermutlich keinen Ceiling-Effekt (das bedeutet, dass bei einem hohen SP-Spiegel kein Sättigungseffekt erreicht wird) und unterliegt auch keinem zirkadianen Rhythmus (Coetzee et al. 2008). Man geht davon aus, dass der NK1-Rezeptor als Autorezeptor funktioniert und SP damit die eigene Ausschüttung modulieren kann. In einigen Studien wurde beschrieben, dass diese Regulation den Charakter eines negativen Feedback-Systems haben könnte (Harrison & Geppetti 2001).

Entsprechend dem weitverbreiteten Vorkommen von SP im Körper spielt sie eine Rolle in vielen verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen. SP ist unter anderem zusammen mit dem Calcitonin Gene-Related Peptide ein Co-Mediator von cholinergen Neurotransmittern. Beide sind gemeinsam an vielen Mechanismen im Zusammenhang mit cholinergischer Innervation im ZNS und PNS beteiligt (Domeneghini et al. 2004). SP beeinflusst als Neuromodulator die Entwicklung und das Wachstum von neuronalem Gewebe. Nach ischämischen Zuständen im Gehirn konnte gezeigt werden, dass SP die Proliferation von

Nervenzellen steigert und so eine Ischämie-induzierte Neurogenese unterstützen könnte (Park et al. 2007). Auch in einem „low-flow“ Ischämie Modell von Moore et al. konnte in den Mesenterialarterien des Kolons von Pferden eine Steigerung von SP während der frühen Reperfusion beobachtet werden (Moore et al. 1996). Eine weitere Studie entdeckte den verstärkenden Effekt von Tachykininen auf die Entzündungsantwort in Ratten nach initiiertes Ischämie der Mesenterialarterien. Es zeigte sich, dass SP die vaskuläre Permeabilität erhöht und vermehrt neutrophile Granulozyten in Folge eines Reperfusionsschadens nach einer Ischämie rekrutiert (Souza et al. 2002). Die Rolle von SP bei der Aktivierung des Immunsystems im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen, insbesondere bei der Chemotaxis von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, konnte ebenso in einigen anderen Studien gezeigt werden (Hunt & Mantyh 2001, Mashaghi et al. 2016, Suvas 2017). Bei einem *in vivo* Versuch an Katzen konnte nach peripherer Entzündungsinduktion durch Carrageen an den Hinterläufen eine erhöhte SP-Konzentration in C-Fasern festgestellt werden (Xu et al. 2000). Bei hoher Konzentration von Lymphozyten im Gewebe, wie zum Beispiel bei einer Weichteilschädigung, stimuliert SP (synergistisch mit dem Calcitonin Gene-Related Peptide) die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor-alpha. Dadurch besteht der Verdacht, dass SP bei der Entstehung von einigen Herzerkrankungen, wie zum Beispiel beim hypertensiven Herzinfarkt oder Fibrose am Herzen, mitwirken kann (Cuesta et al. 2002).

In einer humanmedizinischen Studie konnte im Zusammenhang mit Verletzungen im Weichteilgewebe neben einer signifikanten Erhöhung des Calcitonin Gene-Related Peptides eine mehr als 27-fache Erhöhung von Plasma-SP im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe beobachtet werden (Onuoha & Alpar 1999). Als vasoaktives Peptid kann SP die vaskuläre Permeabilität und die dadurch entstehende Extravasation von Plasmaprotein bei Ödembildung im Gewebe einleiten. Damit ist SP wahrscheinlich einer der potentesten Initiatoren der neurogenen Entzündung (Steinhoff et al. 2014). Dieser pathophysiologische Vorgang spielt vor allem bei einem ischämischen Schlaganfall eine Rolle, da die neurogene Entzündung zu weiterem Zelluntergang führt (Walsh & D 2006, Corrigan et al. 2016, Suvas 2017). In einem Versuch mit Ratten konnte ein Hinweis auf die Rolle von SP bei chronisch entzündlichen Schmerzzuständen beobachtet

werden. Nach Injektion reizender Stoffe an den Hinterläufen von Ratten kam es zu einer signifikanten Hochregulierung der Internalisierung von SP-Rezeptoren im Rückenmark (Honor et al. 1999). Die Rolle von SP in Bezug auf Schmerz und Schmerzweiterleitung ist sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin ein spannendes Thema. In einer Studie zu Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis wurden Menschen mit mindestens dreimonatiger Krankheitsvorgeschichte im Rahmen einer Narkosevoruntersuchung auf das Vorhandensein von SP getestet. Es konnte eine positive Korrelation zwischen der Serum-SP-Konzentration und der chronischen Schmerzintensität der Patienten festgestellt werden (Lisowska et al. 2015). Im Bereich der Rindermedizin hat sich die Untersuchung von SP in Kombination mit Cortisol etabliert, um zwischen akutem Stress durch Handling und anhaltendem Distress ausgelöst durch Schmerz, differenzieren zu können (Tschoner & Feist 2022). In einer Studie mit kastrierten Kälbern und einer Kontrollgruppe stieg SP bei den tatsächlich operierten Tieren an, während Cortisol in beiden Gruppen homogen blieb. Es wird vermutet, dass der durch die Operation entstandene Stress in beiden Gruppen das Cortisol erhöht, jedoch SP im Gegensatz dazu nur durch die chirurgische Verletzung und den damit verbundenen Schmerz ansteigt (Coetzee et al. 2008). Ein aktueller Übersichtsartikel aus 2022 vergleicht viele verschiedene Studien bei adulten Rindern und Kälbern während unterschiedlicher schmerzhafter Eingriffe und körperlicher Zustände und verdeutlicht die Funktion von SP als Biomarker für Entzündung und Nozizeption (Tschoner & Feist 2022). Nach künstlich induzierter Laminitis bei Milchkühen, einer sehr schmerzhaften und hoch entzündlichen Erkrankung der Klauen, wurden klinische Parameter mit einer Reihe von Parametern aus dem Blut untersucht. Im Zusammenhang von SP mit klinischen Schmerzparametern konnte nach sechs Stunden ein markanter Anstieg von SP beobachtet werden, wobei der Höchstwert nach zwölf Stunden erreicht wurde (Bustamante et al. 2015). In einer Studie zur Geburt bei Kühen wurden vier verschiedenen Gruppen untersucht: Erstgebärende und multipare, daneben einfache Geburten und Schweregeburten. Diese wurden in zwei Behandlungsgruppen unterteilt. Die eine Gruppe bekam vier Mal Acetylsalicylsäure (ASS) im Abstand von je zwölf Stunden, die andere ein Placebo. Es wurden drei Biomarker dahingehend untersucht, ob diese in der Behandlungsgruppe niedriger waren als in der unbehandelten. Es wurden Blutproben für die Marker SP (für Nozizeption), Haptoglobin (für Entzündung) und Cortisol (für Stress) untersucht. Insgesamt hatten erstgebärende Kühe höhere SP-

und Cortisolwerte als multipare, wobei SP bei Schweregeburten nach 168 Stunden signifikant erhöht war. Die Behandlung mit ASS hatte lediglich einen Effekt auf die Haptoglobin-Konzentration, nicht auf SP (Barragan et al. 2020). Entgegen der aufgestellten Hypothese kam bei einer Studie zu Uterustorsionen bei Milchkühen heraus, dass SP bei Kühen mit komplikationsfreier Geburt im Vergleich höher war als bei Kühen mit Uterustorsion. Die Erklärung hierfür könnte sein, dass SP mehr durch die Dehnung der Zervix ausgeschüttet wird als durch die Torsion des Uterus. In der Zervix ist bekanntermaßen viel SP enthalten. Kühe mit Torsion zeigten nur milde Kolik und haben noch eine geschlossene Zervix, wohingegen Kühe in Geburt teilweise stärkere Schmerzen zeigen und eine geöffnete Zervix haben (Patak et al. 2000, Sickinger et al. 2018). Durch heterogene Ergebnisse der Untersuchungen zu SP bei Rindern konnte bisher noch nicht abschließend geklärt werden, ob sich SP als Biomarker für Schmerz sicher eignet (Tschoner 2021, Tschoner & Feist 2022). Es wird daher empfohlen, bei zukünftigen Studien zusätzlich zu den Biomarkern auch klinische Parameter zu erfassen, welche physische Parameter als auch das Verhalten der Tiere erfassen (Karlen et al. 2021).

Im Herz-Kreislauf-System ist das SP-NK1-Rezeptorsystem von großer Bedeutung, besonders in dessen zentraler Regulation (Mistrova et al. 2016). An isolierten Herzen von Meerschweinchen zeigte sich, dass SP zu Bradykardie führt. (Hoover et al. 2000). Durch die absinkende Herzfrequenz steigen im Gegenzug die Herzkontraktilität und infolgedessen das Herzschlagvolumen an. Abhängig vom Zustand des Endothels kann SP über eine Reaktionskette die glatte Muskulatur der Gefäßwände entspannen und beeinflusst so im ganzen Körper den Blutdruck durch Vasodilatation (Walsh & D 2006).

Im Bereich des Gastrointestinaltrakts erfüllt SP ebenfalls verschiedene wichtige Funktionen: Einerseits wurde es in der muskulären Hülle von Gefäßen festgestellt und moduliert demnach auch hier den Blutdruck (Domeneghini et al. 2004). Andererseits wirkt SP am equinen Jejunum als non-adrenerger und non-cholinерger Neurotransmitter. In einer in vitro Studie von Malone et al. wurden Anteile glatter Muskulatur aus dem Jejunum mit elektrischer Stimulation behandelt. Anschließend konnte SP über indirekte Immunfluoreszenz im myenterischen Plexus, sowie in zirkulären Muskelschichten nachgewiesen werden (Malone et al. 2000). SP ist an der motorischen Innervation der glatten Muskelschicht beteiligt, wobei es im direkten Vergleich mehr die zirkuläre als die longitudinale Muskulatur kontrahiert

(Malone et al. 2000, Hens et al. 2002). Diese Beobachtung konnte ebenso bei anderen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts von Pferden gemacht werden (Belloli et al. 1994). Bereits im Jahr 2000 wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, in der Zukunft gegebenenfalls therapeutische Ansätze über die Verbesserung der SP-Neurotransmission bei Kolikpatienten zu erwirken, um die Darmmotilität bei Pferden zu verbessern, wenn diese nicht ausreichend auf adrenerge und cholinerge Medikamente ansprechen (Malone et al. 2000). Bei Pferden mit Equiner Grass Sickness konnte bereits im frühen Stadium eine verringerte SP-Immunreaktivität, vor allem im Ileum, festgestellt werden. Die Erkrankung verläuft neben anderen Symptomen mit hochgradiger Dysfunktion des Magen-Darm-Trakts (Bishop et al. 1984). Um das intramurale Nervensystem zu verstehen, wurden von Domeneghini et al. detaillierte histochemische und immunhistochemische Untersuchungen von Dünn- und Dickdarm des Pferdes angefertigt (Domeneghini et al. 2004). SP wurde in der Tunica mucosa, in Nervenzellkörpern und -fasern des submukösen Plexus, sowie in Nervenfasern des myenterischen Plexus festgestellt. Insgesamt wurde SP in fast allen Darmabschnitten gefunden. Lediglich in der Beckenflexur des Kolons war weniger Immunreaktivität des myenterischen Plexus zu sehen. Dies könnte einen Zusammenhang zur Beobachtung haben, dass Pferde sehr häufig an Obstipationen in diesem Darmabschnitt leiden, da durch den verminderten Gehalt an SP eine schlechtere Darmmotilität denkbar wäre (Domeneghini et al. 2004). Bei einem Versuch mit induzierter Obstipation im Kolon durch Amitraz (ein Amidin, welches häufig als Antiparasitikum eingesetzt wird) wurde die Immunreaktivität von SP in der Darmwand vergleichend zu gesunden Ponys untersucht. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Verteilung oder Intensität der SP-Reaktivität festgestellt werden (Cummings et al. 1985).

Bei der Innervation und Regulation von physiologischen, aber auch bei pathologischen Vorgängen des Magens ist SP und alle durch die Substanz angesprochenen Rezeptoren ebenfalls von Bedeutung. Eine Studie mit Schweinen zur Untersuchung von Ulzera am Mageneingang evaluierte, dass Probleme mit der Magenmotilität sowie -entleerung bei Patienten mit Magenulzera möglicherweise mit einer erhöhten SP-Expression in den myenterischen Neuronen des Magens zusammenhängen könnte (Zalecki 2019).

Hervorzuheben in Verbindung mit dieser Arbeit ist eine Dissertation, welche

Neuropeptide in der Labmagenwand von Rindern untersuchte (Sickinger 2007). Vergleichbar zu Koliken bei Pferden mit Darmverlagerungen, kann bei Rindern eine Labmagenverlagerung auftreten. In der Studie wurden während der Operation zur Reposition und Fixation des nach links verlagerten Labmagens Biopsien aus der Labmagenwand entnommen. Im Vergleich zu gesunden Rindern konnte bei einer Verlagerung ein geringerer Gehalt an SP in der Labmagenwand festgestellt werden. Außerdem konnte eine unterschiedliche SP-Konzentration in Bezug auf die verschiedenen Rassen beobachtet werden. Für Labmagenverlagerungen sind vor allem die klassischen Milchrassen wie Holstein-Friesian und Deutsche Holsteins bekannt. Deutlich seltener betroffen sind verschiedene Mastviehrassen. Die Untersuchung der Biopsien ergaben, dass eben die anfälligeren Rassen einen geringeren Gehalt an SP in den Ganglien und Nervenfasern des Magens haben, was eine verminderte Stimulierung für die Labmagenmotilität bewirken und folglich eher zu einer Labmagenverlagerung führen könnte (Sickinger 2007).

Im Allgemeinen gibt es bisher nur begrenzte Studien zur Untersuchung von SP bei Pferden, insbesondere wenn es um die Messung von SP aus dem Blut geht. Im Jahr 2017 wurde eine Studie zur Untersuchung von Stress- und Schmerzparametern bei Tennessee Walking Horses mit gewichtigen Hufkeilen und Ketten durchgeführt (Everett et al. 2018). Die Kontrollgruppe bekam stattdessen normale Hufeisen. Bei beiden Gruppen zeigte sich ein vermindertes Liegeverhalten nach Anbringen der Hufeisen. Das Plasma-Cortisol sank bei allen Pferden jeden Tag etwas ab. Diese Ergebnisse wurden durch die zunächst neue und ungewohnte Situation der Pferde erklärt. Es konnte kein Effekt auf die SP-Plasma-Konzentration festgestellt werden. Zusammenfassend wurde in dieser Studie kein wissenschaftlicher Faktor gemessen, welcher Stress oder Schmerzen durch das Horse-Soring, also durch die Anwendung dieser Praktiken an den Gliedmaßen der Pferde, die der Verstärkung der Aktion der Vorderbeine dient, nachweisen konnte (Everett et al. 2018).

Eine weitere Studie, welche SP im Blut von Pferden evaluierte, basierte auf der Gegebenheit, dass SP im ZNS auch emotionales Verhalten, Stress, Angst und Depression mitreguliert (Kormos & Gaszner 2013). Angesichts der Beobachtung, dass bei Menschen und Ratten SP in Reaktion auf emotionalen Stress ansteigt, führten Scholler et al. ein Stressmodell bei Pferden durch (Ebner et al. 2004, Ebner & Singewald 2006, Scholler et al. 2023). In vier unterschiedlichen Stressgraden wurde die Bedeutsamkeit von SP in Kombination mit Cortisol als Stressparameter

beim Pferd evaluiert. Hinsichtlich des viel diskutierten Tierschutzthemas „Korrekte Verschnallung von Nasenriemen“ wurden Pferde mit lockeren und engen Nasenriemen geritten. Um höhere Stresslevel zu erreichen, wurde zusätzlich ein Overground-Endoskop angebracht. Bei der Messung der Stressparameter ergab sich keine Korrelation zwischen SP und dem jeweiligen Stresslevel, wohingegen Cortisol signifikant zwischen Level eins und vier anstieg. Die Autoren vermuteten, dass der Stress, welchem die Pferden ausgesetzt waren, nicht hoch genug war, um eine messbare Änderung von SP zu erreichen (Scholler et al. 2023).

Methodik & Werte von Substanz P

SP kann systemisch im Blutplasma oder in Speichelproben gemessen werden, wobei in keiner Studie eine Korrelation zwischen beiden Konzentrationen festgestellt werden konnte (Coetzee et al. 2008, Jasim et al. 2018). Lokale Proben können außerdem aus Synovia oder Gewebestücken genommen werden (Sickinger 2007, de Grauw et al. 2014). Die Messung von SP als Neuropeptid im Liquor ist zur Erforschung von Cluster-Kopfschmerzen oder zum Beispiel bei neuronaler Schädigung nach Schlaganfällen verbreitet (Clark et al. 1994, Li et al. 2009).

Zusammenfassend sind SP-Plasmawerte zwischen den einzelnen Studien sehr unterschiedlich und auch die Kontrollgruppen in humanmedizinischen Studien stellen sich inhomogen dar (Reynolds et al. 1988, Lee et al. 1997). SP-Werte von gesunden Menschen werden zum Beispiel mit durchschnittlich 65 pg/ml angegeben (Wang et al. 2012). Gleiches zeigte sich auch in Studien mit Rindern (Tschner & Feist 2022). Die SP-Konzentrationen der Kontrollgruppe in einer Studie mit lahmen Milchkühen bewegte sich zum Beispiel im Bereich $0,25 \pm 0,09$ ng/ml (= 250 ± 90 pg/ml) (Rodriguez et al. 2018). Bisher sind wenige Normwerte von SP-Plasma bei Pferden bekannt. In der Studie von Everett et al. bewegten sich die SP-Werte der Kontrollgruppe im Bereich von $91,8 \pm 6,9$ pg/ml (Everett et al. 2018). Scholler et al. versuchte mit 74 gesunden, adulten Warmblütern Referenzwerte für Pferde zu evaluieren. Es ergaben sich große interindividuelle Unterschiede. Die Plasma-SP-Werte befanden sich zwischen 643 pg/ml und 8019 pg/ml. Abgesehen davon zeigte sich, dass die intraindividuelle SP-Konzentration eines Pferdes unabhängig von der Belastung annähernd gleich blieb (Scholler et al. 2023).

Die Probenbearbeitung von SP ist aufgrund der kurzen Halbwertszeit von ungefähr 3,5 Minuten sehr sensibel (Saidi et al. 2016). Um SP zu stabilisieren, sollte am

besten ein Protease-Inhibitor im Blutröhrchen enthalten sein oder anschließend hinzugefügt werden. Aprotinin zeigte sich als effektivster Inhibitor gegen den Abbau durch Peptidasen. Ohne Zusatz sinkt die SP-Konzentration bereits innerhalb einer Stunde bei Raumtemperatur. Idealerweise werden die Proben mit Aprotinin versetzt und anschließend bei -70°C eingefroren (Mosher et al. 2014). Die Proben werden üblicherweise mit Hilfe eines Radioimmunoassays (RIA) oder eines enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (EIA) analysiert. Es wird vermutet, dass die Selektivität der einzelnen Assays, im Besonderen wegen der Kreuzreaktivität mit anderen SP-Metaboliten, von den verwendeten Antikörpern abhängt. Da es einige verschiedene RIA's und EIA's auf dem Markt gibt, könnten auch hierdurch unterschiedliche SP-Werte resultieren (Feickert & Burckhardt 2019).

Es ist bekannt, dass SP-enhaltende Neuronen signifikant in der Konzentration und Verteilung je nach Alter von Menschen und Tieren variieren. Beispielsweise konnte bei Ratten nachgewiesen werden, dass sich das maximale Level postnatal zwischen fünf und 15 Tagen befindet und die Dichte sich anschließend wieder verringert (Sakanaka et al. 1982). Eine Studie zu Kastrationen bei Kälbern stellte fest, dass Tiere im Alter von acht Wochen niedrigere SP-Werte aufwiesen als sechs Monate alte, unabhängig davon, welcher Gruppe sie angehört haben (Dockweiler et al. 2013). Wong et al. analysierten Normwerte von SP in gesunden Neonaten. Sie fanden heraus, dass SP-Konzentrationen postnatal über drei Tage anstiegen und bis zum Tag 14 wieder absanken (Wong et al. 2010). Zum Pferd sind diesbezügliche Studien bisher nicht bekannt.

Zusammenfassend erscheint es bislang nicht sinnvoll, SP-Werte aufgrund des unterschiedlichen Versuchsaufbaus und insgesamt schwieriger Methodik zwischen verschiedenen Studien miteinander zu vergleichen (Feickert & Burckhardt 2019, Tschoner & Feist 2022).

3.3. Alpha-Amylase

Aufbau & Vorkommen von Alpha-Amylase

Die Alpha-Amylase (AA) hat die Funktion, wie andere Glykosidhydrolasen auch, Polysaccharide abzubauen. AA im Speziellen ist für die enzymatische Spaltung von α -(1,4)-glykosidischen Bindungen und damit für die Verdauung von Kohlenhydraten wie zum Beispiel Stärke zuständig (Wolffram 2022). Sie wird sowohl direkt im Speichel als auch im Pankreas gebildet. Die Speichel-AA wird lokal durch die Speicheldrüsen, kodiert durch das Gen AMY1, produziert und repräsentiert daher weder den Gehalt an AA im Kreislaufsystem noch im Magen-Darm-Trakt. Die Pankreas-AA wird durch das AMY2 Gen kodiert und in aktiver Form von den Acinuszellen durch Exozytose sezerniert und anschließend zur Verdauung in das intestinale Lumen abgegeben (Granger et al. 2007, Coizet et al. 2014, Schröder & Rummel 2022).

Im Vergleich zu anderen Tierarten ist der Gehalt an AA im Pferdedarm gering, da die natürliche Ernährungsweise des Pferdes eher stärkearm ist. Allerdings gibt es große individuelle Unterschiede. Pferde, die mit getreidehaltigem Futter gefüttert werden, haben eine höhere Aktivität und Expression von AA als Pferde, die auf der Weide stehen (Kienzle et al. 1994, Wolffram 2022). Eine Studie, welche die AA-Gene unterschiedlicher Pferderassen untersuchte, lieferte erste Hinweise auf mögliche Zusammenhänge zwischen der Genetik und dem Ernährungsmanagement (Coizet et al. 2014). Diese Ergebnisse werden durch Erkenntnisse beim Menschen untermauert, da Populationen mit stärkereicher Ernährung im Durchschnitt mehr AMY1-Kopien aufweisen als solche mit traditionell stärkearmer Ernährung (Perry et al. 2007, de Sousa-Pereira et al. 2015).

Funktionen von Alpha-Amylase

Die AA wird als Biomarker eingesetzt, um die Aktivität eines der wichtigsten Stressreaktionssysteme des Körpers, dem autonomen Nervensystem, widerzuspiegeln (Fuentes-Rubio et al. 2016, Skoluda et al. 2017). Dabei kann Speichel-AA mit physiologischem Stress aber auch mit psychologischen Faktoren zusammenhängen. Die zweite große Stresskomponente stellt die HPA-Achse dar, weswegen in Studien häufig AA in Kombination mit Cortisol gemessen wird. Besonders bei der Messung im Speichel ist es wichtig, die unterschiedlichen Höhepunkte der Ausschüttung der Biomarker bei der Antwort auf Stress zu

beachten. Cortisol-Änderungen treten mit gewisser Verzögerung über die Aktivierung der HPA-Achse, Freisetzung ins Blut durch die Nebennierenrinde bis zur Diffusion in den Speichel auf. Die Speichel-AA wird hingegen direkt in den Speicheldrüsen gebildet (Granger et al. 2007, Tecles et al. 2014).

In einer Studie mit zwei verschiedenen Trainingsgruppen wurde Speichel-AA als Parameter für Stress während des Trainings von Pferden eingesetzt. Die Pferde, welche von Trainern mit besseren reiterlichen Fähigkeiten geritten wurden, zeigten im Mittel niedrigere Speichel-AA-Werte (Kimura et al. 2023). Distanzpferde wurden hinsichtlich des Stresses in Verbindung mit körperlicher Belastung in einem standardisierten Training mit steigender Intensität auf einige Biomarker getestet. Die Speichel-AA stieg unter Belastung an und die höchsten Werte wurden 30 Minuten nach der Belastung gemessen. Da die Werte ebenfalls positiv mit dem Index des sympathischen und negativ mit dem Index des parasympathischen Nervensystems korrelierten, wurden sie als hilfreich zur Evaluierung von trainingsbedingtem Stress bei Pferden bewertet. Das Fitnessniveau dieser Pferde korrelierte hingegen nicht mit den gemessenen Werten (Contreras-Aguilar et al. 2021). Bei experimentell ausgelöstem Stress konnte zum Beispiel eine Erhöhung der Speichel-Butyrylcholinesterase beobachtet werden, die Speichel-AA-Werte bei entspannten Pferden waren hingegen besonders niedrig (Contreras-Aguilar et al. 2019).

Die bei Hunden häufig vorkommende Pankreatitis wurde früher oftmals mit erhöhter Serum-AA (und auch Serum-Lipase) diagnostiziert. Inzwischen ist jedoch bekannt, dass beide Parameter weder spezifisch noch sensitiv genug für eine Diagnosestellung sind (Strombeck et al. 1981, Steiner et al. 2008). Diese beim Fleischfresser gut bekannte Erkrankung tritt beim Pferd wesentlich seltener auf und die Diagnostik ist dementsprechend schwierig (Yamout et al. 2012). Oft geht sie in Kombination mit Symptomen des Magen-Darm-Trakts einher und wird häufig erst post mortem diagnostiziert. Bei erhöhter Serum-AA beim Pferd sollten neben Pankreatitis noch zwei andere Differenzialdiagnosen beachtet werden: Schädigung der Zellen der Darmschleimhaut und primäres Nierenversagen (Parry & Crisman 1991).

Contreras-Aguilar et al. veröffentlichten einige Studien zu Speichel-AA bei Pferden. In der ersten Pilotstudie wurden verschiedene Biomarker im Zusammenhang mit akutem Abdomen gemessen. Die Speichel-AA-Aktivität war

bei den Kolikpatienten signifikant höher als bei den gesunden Pferden. Sie korrelierte außerdem mit der EAAPS-1, was anschließend in einer größeren Studie bestätigt werden konnte (Contreras-Aguilar et al. 2018, Contreras-Aguilar et al. 2019). In einer Folgestudie wurde Speichel-AA mit dem Schweregrad der Erkrankung und dem Überleben verglichen. Eine gesteigerte Aktivität konnte signifikant mit einem erhöhten Sterberisiko bei Pferden mit Kolik verbunden werden (Contreras-Aguilar et al. 2019).

Methodik & Werte von Alpha-Amylase

Referenzwerte für Serum-AA werden in der Literatur mit 21 ± 6 U/l und in der Peritonealflüssigkeit mit 5 ± 4 U/l angegeben (Parry & Crisman 1991). Die AA im Speichel von gesunden Pferden beträgt im Mittel 13,5 U/l. Der Grenzwert für eine akute Kolikerkrankung wird im Speichel mit 23,3 U/l angegeben (Contreras-Aguilar et al. 2019). Dabei wird immer die Aktivität, nicht die Konzentration der AA gemessen (Contreras-Aguilar et al. 2019). Die Aktivität der AA im Pankreasgewebe von Pferden wurde in einer Studie mit 277 ± 265 U/g und im Chymus des Jejunums mit 22,3 U/g angegeben. Zum Zäkum hin nimmt die AA-Aktivität ab. Die höchsten Werte konnten postprandial vier bis fünf Stunden nach dem Füttern gemessen werden (Kienzle et al. 1994).

Eine Pilotstudie zu Veränderungen von Biomarkern im Speichel von Pferden in Abhängigkeit vom zirkadianen Rhythmus und der Jahreszeit untersuchte in diesem Zusammenhang auch die Speichel-AA. Es zeigte sich zwar, dass sich AA im Speichel im Laufe des Tages veränderte und die jeweils höchsten Werte morgens um 6.30 Uhr analysiert wurden, ein zirkadianer Rhythmus konnte jedoch nicht festgestellt werden (Contreras-Aguilar et al. 2020). Diese Ergebnisse decken sich mit denen aus Langzeitstudien in der Humanmedizin (Skoluda et al. 2017). Es gibt jedoch Anzeichen dafür, dass die Aktivität der Speichel-AA saisonalen Schwankungen unterliegt, da im Winter höhere Werte gemessen wurden als im Sommer (Contreras-Aguilar et al. 2020). Daneben ist es bei Speichelproben wichtig, auf die Kontamination mit möglichen Futtermitteln aus der Maulhöhle zu achten. Eine Studie evaluierte, dass die Inkubation mit Gras oder Heu die Speichel-AA-Ergebnisse signifikant beeinflussen kann (Contreras-Aguilar et al. 2020).

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Zielsetzung

Kolik ist eine häufige und gleichzeitig tödliche Erkrankung von Pferden. Um Kolikpatienten eine angemessene Therapie zukommen zu lassen, wird eine objektive Bewertung der Symptome und des Verlaufs der Erkrankung angestrebt.

Ziel dieser Studie war es, neue biochemische Parameter mit bereits etablierten zu vergleichen und sie auf ihr Potenzial als Prognoseparameter zu untersuchen. Die Biomarker Substanz P und Alpha-Amylase wurden bei 30 Kolikpatienten, graduiert durch die Equine Acute Abdominal Pain Scale, analysiert und mit den anerkannten Parametern Herzfrequenz, Laktat und Cortisol verglichen.

2. Stress- und Schmerzparameter

Die Studie über Substanz P ist als Publikation unter III.3. zu finden.

Zusätzlich wurden einige Voruntersuchungen zu SP und AA durchgeführt. Die Methoden und Ergebnisse, die nicht Teil der Veröffentlichung sind, werden folgend beschrieben.

2.1. Substanz P

Material & Methode der Voruntersuchung

In einer Vorstudie wurde die Methodik und Analyse von SP an 21 Kolikpatienten geprüft. Die Probenentnahme und Untersuchung der Pferde fanden analog zur Beschreibung in der Publikation statt. Abweichend davon gehörten die Patienten in der Voruntersuchung unterschiedlichen Pferderassen an und es waren alle Altersklassen vertreten. Als weitere Limitation der Vorstudie war die nicht einheitliche Vorbehandlung der Pferde zu sehen. In der Voruntersuchung wurde außerdem je Patient nur ein Wert direkt nach Einlieferung in die Klinik aufgrund vorberichtlicher Koliksymptomatik bestimmt. Das Blut für SP wurde für die erste Analyse direkt in Aprotinin-beschichtete Röhrchen (BD vacutainer blood collection tubes, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) umgefüllt und innerhalb von zwei Stunden bearbeitet und eingefroren. Laktat wurde direkt aus dem Frischblut mit einem Point-of-Care- Handgerät (Accutrend Plus, Roche

Deutschland Holding GmbH, Germany) gemessen.

Die Kolikpferde wurden, wie in der Publikation beschrieben, anhand der EAAPS in drei Gruppen eingeteilt: geringgradig (Score 0-1), mittelgradig (Score 2-3) und hochgradig (Score 4-5) (Sutton et al. 2013).

Für die statistische Analyse der Voruntersuchung wurde Python 3.9.13 (main, Aug 25 2022, 23:51:50) in Verbindung mit der SCIPY-Bibliothek 1.11.2 verwendet. Die Normalverteilung wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test überprüft. Da die Daten nicht normalverteilt waren, wurde als statistische Analyse der Spearman-Korrelationskoeffizient r berechnet. Bei einem r -Wert von $0,0 < 0,1$ besteht keine, von $0,1 < 0,3$ eine geringe, von $0,3 < 0,5$ eine mittlere, von $0,5 < 0,7$ eine hohe und von $0,7 < 1$ eine sehr hohe Korrelation.

Ergebnisse der Voruntersuchung

Insgesamt wurden bei der Voruntersuchung acht gering-, 10 mittel- sowie drei hochgradige Kolikpatienten mit einbezogen. Die SP-Werte erreichten eine Spannweite zwischen 447,0 pg/ml und über 10.000,0 pg/ml, was den messbaren Bereich des verwendeten ELISA Kits (von Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA) überschritt. Um für die statistische Analyse eine rechenbare Zahl zu erhalten, wurden die Werte der drei Pferde über 10.000 pg/ml auf genau 10.000,0 pg/ml gesetzt. Die SP-Werte der Kolikpatienten zeigten insgesamt eine mittlere Korrelation mit dem Kolikgrad ($r=0,394$). Zwischen den gering- und den mittelgradigen Patienten bestand ebenfalls eine mittlere Korrelation ($r=0,367$), zwischen den mittel- und hochgradigen jedoch gar keine Korrelation ($r=0,0$). Zwischen den gering- und hochgradigen Pferden mit Kolik ergab sich eine hohe Korrelation ($r=0,516$).

Die Laktatwerte reichten von < 1 bis 12,2 mmol/l. Um für die statistische Analyse eine rechenbare Zahl zu erhalten, wurden die Werte der Pferde < 1 auf genau 1,0 mmol/l gesetzt. Beim Vergleich aller Gruppen ergab sich für Laktat eine geringe Korrelation mit den verschiedenen Kolikgraden ($r=0,264$). Zwischen den gering- und mittelgradigen, sowie zwischen den mittel- und hochgradigen Patienten ergab sich eine geringe Korrelation ($r=0,218$; $r=0,123$). Die Korrelation bei den gering- zu hochgradigen Pferden mit Kolik war mittelgradig ($r=0,339$). Im Vergleich von SP mit Laktat bestand eine geringe Korrelation ($r=0,166$). Die Ergebnisse werden in den folgenden Tabellen 4 und 5 dargestellt:

Pferd Nr.	Alter in Jahren	Rasse	Kolikgrad	SP-Wert in pg/ml	Laktat in mmol/l
1	21	Isländer	ggr.	2.108,30	2,9
2	7	Isländer	ggr.	687,8	1
3	5	Warmblut	ggr.	701,5	1
4	12	Vollblut	ggr.	447	1
5	13	Warmblut	ggr.	1.175,00	1
6	18	Warmblut	ggr.	905,8	2,3
7	20	Friese	ggr.	521,8	1,4
8	6	Warmblut	ggr.	1.092,80	1,7
9	14	Warmblut	mgr.	10.000,00	1
10	30	Shetlandpony	mgr.	780,9	1,3
11	14	Isländer	mgr.	10.000,00	4,9
12	3	Murgese	mgr.	2.290,40	1,2
13	13	Araber	mgr.	4.257,00	4,2
14	11	Lusitano	mgr.	10.000,00	1,2
15	5	Warmblut	mgr.	850,4	1,5
16	13	Warmblut	mgr.	962,6	1,1
17	11	Friese	mgr.	582,7	1,2
18	20	Shetlandpony	mgr.	614,7	2,5
19	14	Warmblut	hgr.	2.006,50	2,4
20	13	Warmblut	hgr.	2.787,90	1
21	25	Tinker	hgr.	913,7	12,2

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse von SP aus der Voruntersuchung mit Alter, Rasse und dem jeweiligen Kolikgrad der Pferde. Die Kolikgrade sind in gering-, mittel- und hochgradig (ggr., mgr., hgr.) angegeben. Zugehörig sind die Ergebnisse von SP in pg/ml und Laktat in mmol/l aufgelistet.

Substanz P	Min.	Max.	Mittelwert	Median	SD
Ggr. Kolikpatienten (n=8)	447,0	2.108,30	955,0	803,6	497,7
Mgr. Kolikpatienten (n=10)	582,7	10.000,00	4.033,90	1.626,50	4.045,10
Hgr. Kolikpatienten (n=3)	913,7	2.788,00	1.902,70	2.006,50	768,7

Tabelle 5: Plasma-SP-Werte in pg/ml der gering-, mittel- und hochgradigen Kolikpatienten aus der Voruntersuchung.

Da die Methodik der Voruntersuchung Limitationen aufwies, wurde der Versuchsaufbau in der anschließend geplanten, standardisierten Studie wie in der Diskussion und der Publikation beschrieben (s. Abschnitte III.3. und IV.) angepasst und verbessert.

Ergebnisse der Studie

Die Ergebnisse von SP sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Die weiteren Ergebnisse sind unter III.3. zu finden. Von allen 30 Patienten wurden je vier Proben im Abstand von einer Stunde entnommen. Wenn Patienten operiert oder euthanasiert werden mussten, wurde die Probenentnahme bei diesen Patienten gestoppt. Dies führte zu einer Gesamtzahl von 107 SP-Werten. Die SP-Konzentrationen reichten von 52,5 bis 2.716 pg/ml. Ein einzelner Wert war über 10.000,0 pg/ml. Um für die statistische Analyse eine rechenbare Zahl zu erhalten, wurde auch dieser Wert auf genau 10.000,0 pg/ml gesetzt.

Substanz P	Min.	Max.	Mittelwert	Median	SD
Ggr. Kolikpatienten (n=62)	52,5	10.000,0	450,2	171,0	1.295,3
Mgr. Kolikpatienten (n=32)	61,2	2.716,0	398,3	212,1	597,3
Hgr. Kolikpatienten (n=13)	68,4	378,5	192,0	194,3	80,9

Tabelle 6: Plasma-SP-Werte in pg/ml der gering-, mittel- und hochgradigen Kolikpatienten aus der Studie.

2.2. Alpha-Amylase

Material & Methode der Voruntersuchung

Die AA wurde unter demselben Vorgehen wie bei SP in der Voruntersuchung gemessen. Insgesamt wurden 67 Kolikpatienten beprobt. Auch hier bestand die Limitation, dass die Pferde verschiedenen Rassen angehörten und alle Altersgruppen repräsentiert waren. Darüber hinaus variierte die Vorbehandlung der einbezogenen Pferde. In der Voruntersuchung wurde je Patient ein Wert direkt nach Einlieferung in die Klinik aufgrund von Koliksymptomatik bestimmt. Die Serum-Blutproben für die Messung von AA wurden im Zuge der Blutentnahme für das Intensivlabor der Klinik entnommen. Die Proben wurden innerhalb von zwei Stunden nach Blutentnahme bei 2000 g für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Sie wurden bis zur Analyse bei -20°C eingefroren. Die Proben wurden durch eine photometrische Messung eines Autoanalyse-Systems ausgewertet (Cobas C311, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Die statistische Analyse erfolgte analog zur Voruntersuchung von SP.

Ergebnisse der Voruntersuchung

Insgesamt wurden bei der Voruntersuchung der AA-Methodik 29 gering-, 23 mittel-, sowie 15 hochgradige Kolikpatienten einbezogen. In der Voruntersuchung konnte eine AA-Aktivität von 0 bis 1.226,3 U/l gemessen werden. Die AA-Werte der Kolikpatienten zeigten insgesamt eine geringe Korrelation mit dem Kolikgrad ($r=0,015$). Zwischen den einzelnen Graden bestand ebenfalls eine geringe Korrelation (gering- zu mittelgradig: $r=0,037$; mittel- zu hochgradig: $r=-0,028$; gering- zu hochgradig: $r=0,008$).

Alpha-Amylase	Min.	Max.	Mittelwert	Median	SD
Ggr. Kolikpatienten (n=29)	1,5	103,6	8,7	4,2	18,7
Mgr. Kolikpatienten (n=23)	0,6	480,4	42,1	4,7	113,1
Hgr. Kolikpatienten (n=15)	0	1.226,3	97,9	4,4	313,9

Tabelle 7: Serum-AA-Werte in U/l der gering-, mittel- und hochgradigen Kolikpatienten aus der Voruntersuchung.

Material & Methode der Studie

Die Untersuchungen zu AA wurden gemeinsam mit der im Rahmen dieser Dissertation veröffentlichten Studie durchgeführt. Daher entsprechen die Patienten, die Vorgehensweise, der Studienablauf, sowie die statistischen Berechnungen der Beschreibung unter III.3. Ein p-Wert unter 0,05 gilt als signifikant.

Ergebnisse der Studie

Die niedrigste AA-Aktivität betrug 1,6 und die höchste 95,7 U/l. Zwischen AA und den Kolikgraden konnte kein Zusammenhang festgestellt werden (gering- zu hochgradig $p=1,0$). Es bestand keine signifikante Assoziation im Vergleich von AA mit den Parametern SP ($p=0,356$), Cortisol ($p=0,111$) und der Herzfrequenz ($p=0,054$). Ein signifikanter Zusammenhang zeigte sich zwischen AA und Laktat ($p=0,032$; Abbildung 2).

Alpha-Amylase	Min.	Max.	Mittelwert	Median	SD
Ggr. Kolikpatienten (n=62)	3,0	53,4	10,6	6,0	11,5
Mgr. Kolikpatienten (n=32)	3,0	10,2	7,1	6,4	4,2
Hgr. Kolikpatienten (n=13)	3,0	95,7	14,5	6,4	24,1

Tabelle 8: Serum-AA-Werte in U/l der gering-, mittel- und hochgradigen Kolikpatienten aus der Studie.

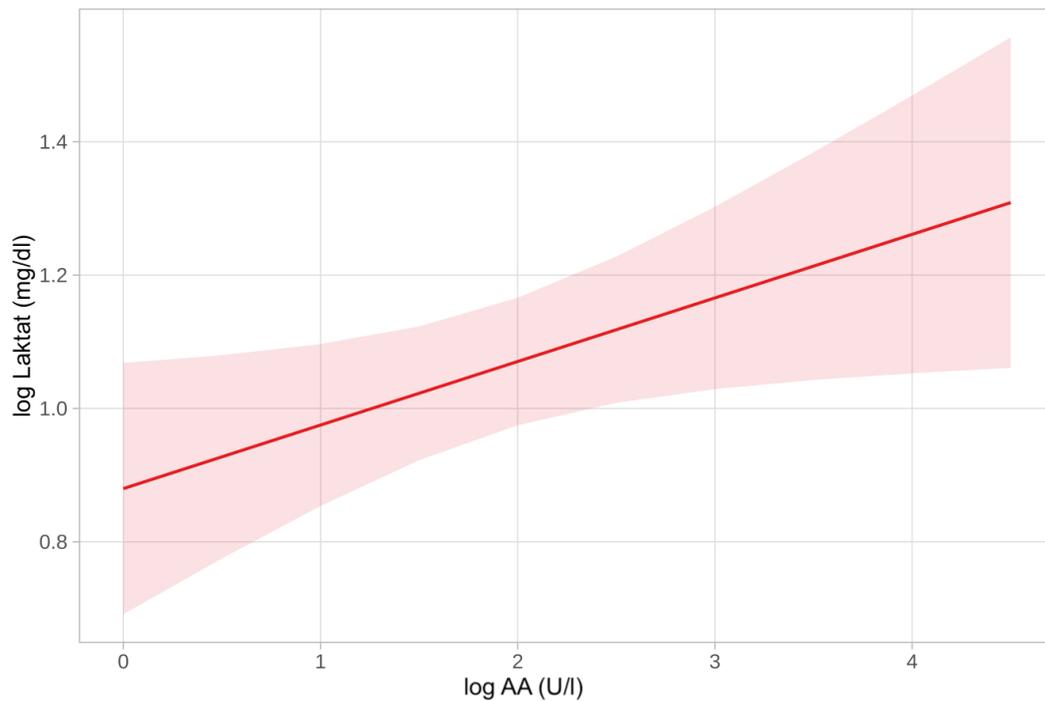


Abbildung 2: Signifikanter Zusammenhang zwischen AA und Laktat ($p = 0,032$). Bei steigendem Laktat steigt dabei auch AA an. Zur besseren Veranschaulichung wurde die logarithmierte Darstellung gewählt.

3. Publikation

Die zur Dissertation gehörige Publikation wurde am 08. Dezember 2023 im Journal of Equine Veterinary Science veröffentlicht:

Evaluation of substance *P* as a biomarker for pain in equine colic

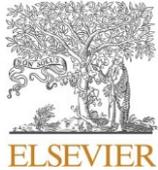
Nina Gruber ^a, Stefan Gesell-May ^b, Dominik Scholler ^a, Yuri Zablotski ^c, Anna May ^{a,*}

^a Equine Hospital, Ludwig Maximilians University Munich, Sonnenstrasse 14, 85764 Oberschleissheim, Germany

^b Center for Equine Ophthalmology, Munich, Germany

^c Clinic for Ruminants, Ludwig Maximilians University Munich, Sonnenstrasse 13, 85764 Oberschleissheim, Germany

* Corresponding author; E-mail address: Anna.May@lmu.de



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Journal of Equine Veterinary Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jevs



Original Research

Evaluation of substance P as a biomarker for pain in equine colic

Nina Gruber^a, Stefan Gesell-May^b, Dominik Scholler^a, Yury Zablotski^c, Anna May^{a,*}

^a Equine Hospital, Ludwig Maximilians University Munich, Sonnenstrasse 14, 85764 Oberschleissheim, Germany

^b Center for Equine Ophthalmology, Munich, Germany

^c Clinic for Ruminants, Ludwig Maximilians University Munich, Sonnenstrasse 13, 85764 Oberschleissheim, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:
Equine
Colic
Pain
Prognosis
Substance P

ABSTRACT

Equine colic is an important condition associated with acute abdominal pain and one of the leading causes of death in horses. As such, objectively evaluating pain is of interest for attending veterinarians. Pain scales for assessment are present, but no single pain-specific biomarker has been reported. The aim of this study was to determine if substance P (SP) could be a reliable biomarker to reflect pain and serve as a parameter to predict outcome in equine colic. The hypothesis was that horses displaying severe colic signs present with higher values of SP in contrast to those with mild colic signs. Thirty warmblood horses, aged between 3 and 20 years were recruited; evenly distributed (10 horses each) in three colic groups (mild, moderate, severe). To classify the colic signs, the horses were graded by the Equine Acute Abdominal Pain Scale (EAAPS). Clinical examination and EAAPS were performed at arrival in the hospital. Blood samples were collected four times in hourly intervals commencing from arrival. For comparison, already established parameters for prognosticating equine colic (heart rate, serum cortisol, and blood lactate concentration) were also measured. The assumption of increasing SP concentrations along with pain could not be confirmed. SP did not show any association with heart rate, cortisol, lactate, or EAAPS. Whereas the established parameters increased according to the EAAPS, SP remained stable in individual horses regardless of clinical signs, treatment, and disease progression. Consequently, SP was not a reliable parameter to reflect painful conditions or to predict outcome in equine colic.

1. Introduction

Colic as a sign of acute and painful conditions of the equine abdomen is still one of the most common emergencies and cause for sudden death in horses [1,2]. The importance for owners as well as veterinarians is reflected by a large number of studies on predictive models [3,4] and also by investigations of single parameters for prognosticating equine colic [5,6]. Cortisol, lactate, and heart rate correlate significantly with an increased risk of non-survival in horses with colic [5,7-9]. Age, respiratory rate, mucous membranes and capillary refill time, quality of gastrointestinal sounds, localization of the lesion, hematocrit and total protein in peritoneal fluid have also been reported to be helpful for defining prognosis in equine colic [3-5,10-13]. Transrectal palpation can be valuable for diagnosis and prognosis in adult horses, but may lack specificity [14].

Precise analgesic management is essential in colic, with adjustments ideally performed with the guidance of a pain-specific biomarker. Pain and colic severity assessment scoring systems [10,15,16] and potential biomarkers such as substance P (SP) are candidates for investigation.

Substance P was first discovered in 1931 by Euler and Gaddum as an agent for smooth muscle stimulation and blood pressure regulation in the brain and intestine [17,18]. As an undecapeptide, it consists of a chain with eleven amino-acids and belongs to the family of tachykinins [19]. Substance P acts as a neurotransmitter in the peripheral and central nervous system, particularly in the dorsal horn of the spinal cord of vertebrates [20,21] but was also reported to be produced by non-neural cells like endothelial cells, bone marrow stromal cells, epithelial cells and inflammatory cells [22,23]. Consequently, a wide range of other functions are attributed to the neuropeptide, such as neuromodulation [24], inflammatory immune system activation [22,25], cardiovascular regulation [26], and involvement in emotional behaviors like anxiety and stress [27,28].

In cattle, SP is accepted to be a reliable parameter for evaluation of pain, despite partially heterogenous study results [29-31]. It is mainly investigated in combination with cortisol, which helps to differentiate between emotional stress through handling and nociception [31,32]. While cortisol increases with any sort of stress and showed no difference between an executed and a simulated castration in calves, SP rose

* Corresponding author.

E-mail address: Anna.May@lmu.de (A. May).

N. Gruber et al.

exclusively due to pain occurring after genuine castration [33]. In horses with colic SP could be produced by stretched, damaged gut wall tissue and irritation of the peritoneum as well as by the spill-over of highly excited synapses of the SP neuron population [22,24,34,35]. Hence, SP could serve as biomarker of specific neural activity or simply as a marker of inflammation [36,37], both being relevant in colic. SP is released from primary afferent fibers and upregulates NK1 receptors in dorsal horn neurons [20]. Since neuropeptides like SP diffuse far from their site of release in the intercellular space it could enter the circulation and therefore may be a suitable biomarker of pain-associated neural activity [38]. The aim of this study was to determine the suitability of SP as a biomarker of pain in horses with colic. The hypothesis was that horses displaying severe colic signs present with higher values of SP in contrast to those with mild colic signs. The objectives were to determine whether SP increases with pain, measured using an equine pain score, and secondly, to compare SP to the established parameters heart rate, cortisol, and lactate in acute abdominal disease.

2. Materials and methods

Ethical approval was granted by the Ludwig Maximilians University's ethics committee, protocol number: 356-31-03-2023.

2.1. Animals

In this study 30 warmblood horses, including 8 mares and 22 geldings with an average age of 11.9 ± 4.54 years, were examined in two different equine hospitals as a convenience sample population (Equine Hospital Pferdekllinik in Parsdorf, Parsdorf/Vaterstetten, and Equine Hospital Munich-Airport, Hallbergmoos, both Germany). The horses had been referred to the hospitals with signs of colic and each horse was assigned to three pain grades (mild, moderate, severe) based on the Equine Acute Abdominal Pain Scale (EAAPS) as shown below. Only horses without any known pre-existing medical condition other than colic were included in the study. Additionally, inclusion criteria for the study were that the animals had not been pretreated more than once with butylscopolamine, metamizole, or xylazine by the referring veterinarian. However, there were also horses that did not receive any pre-treatment. Further, only horses with gastrointestinal disease confirmed by the treating veterinarian of the equine hospital were included.

2.2. Study design

An analytical, observational cohort design was used.

Directly after arrival in the equine clinic, a jugular venous catheter was placed by the examining veterinarian, and blood for emergency laboratory work (including packed cell volume (PCV), total protein, and lactate) and first samples for the study were drawn simultaneously while the EAAPS rating was performed. During the general examination the heart rate was determined to be matched with the first timepoint of the blood samples. Afterwards, the colic patients were investigated thoroughly by nasogastric tubing, transrectal examination, abdominal FLASH ultrasound [39], and abdominocentesis, if needed. The study did not alter the standard examination described above, nor did it affect the treatment of the horses. Depending on the horses' clinical appearance and laboratory parameters, they received medication, intravenous fluids or controlled exercise in the riding arena. A variety of medications were administered as required, including butylscopolamine, metamizole, flunixin-meglumine, xylazine, detomidine, butorphanol, neostigmine, lidocaine, and metoclopramide. In between, further standard pain scorings in EAAPS were performed synchronously with hourly blood sampling when blood samples were collected at a total of four times. If a horse needed colic surgery, sampling was terminated when anesthesia was induced. The same applied to euthanized horses.

To measure concentrations of blood lactate concentration, serum cortisol concentration, and SP blood samples were taken out of the

venous catheter. At each sampling time point, 20 ml blood were discarded, and subsequently, 20 ml blood were collected in two serum tubes for serum cortisol concentration analyses, as well as one tube coated with aprotinin, a protease inhibitor to stabilize SP (BD vacutainer blood collection tubes, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) [40]. Blood lactate was measured instantly out of the whole blood by a point-of-care handheld system (Accutrend Plus, Roche Deutschland Holding GmbH, Germany). The aprotinin samples were centrifuged immediately at $3,500 \times g$ for 15 min. Twenty minutes after sampling, the serum tubes were centrifuged at $2,000 \times g$ for 10 min. Both, aprotinin plasma and serum were pipetted into 1.5 ml Eppendorf tubes and frozen at -20°C until evaluation. The samples were stored one week to two months prior to analysis. For transfer from the equine hospitals to the laboratory, the samples were stored on dry ice.

For measuring SP, an SP ELISA kit (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA) was used. The manufacturer's information is: (analytical) sensitivity 5.3 pg/ml (range 9.76–10,000 pg/ml). The samples for SP, just like the ones for serum cortisol concentration, were analyzed in duplicate by the laboratory for ruminants (LMU Munich, Oberschleissheim, Germany) according to the manufacturer's instructions as described and performed in other studies [33,41]. For Serum cortisol concentration, an ELISA kit validated for horses by DRG International Inc. (Springfield, NJ, USA) was utilized and performed as described elsewhere [41,42].

2.3. Equine Acute Abdominal Pain Scale

The EAAPS was performed for all colic patients of this study as described previously [15,43,44]. As abdominal pain is dynamic and can occur in waves, horses may not always exhibit clinical signs, as applies after administration of analgetic medications. Accordingly, horses with no clinical signs at the time of examination were added to the mild group when the treating veterinarian confirmed gastrointestinal findings. Otherwise, the horse was not included in the study.

2.4. Statistical analysis

Data analysis was performed using R 4.3.1 (2023-06-16, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

The distribution of response variables was visually examined. Most of the response variables displayed skewness, so log-transformed values were employed to align with model assumptions. The subsequent model assumptions were consistently verified: (1) the normality of data was checked by the Shapiro-Wilk normality test, (2) the homogeneity of variances between groups was checked with Bartlett test, and (3) the heteroscedasticity (constancy of error variance) was checked with Breusch-Pagan test. In case the assumptions were met, a linear model or a mixed-effect linear model was applied. In case the assumptions did not meet, Kruskal-Wallis's test, a robust linear (R package – robustbase), or a robust mixed-effects linear model (R package – robustlmm) was applied. Following model-fitting with estimated marginal means (R package – emmeans) by Tukey *P*-value correction for multiple comparisons, all contrasts (differences) between specific categories were evaluated.

Due to the limited sample size and potential overfitting and multicollinearity, no multivariable analysis was conducted. Results with a *P*-value < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Substance P

Concentrations of SP ranged from 52.5 to 2,716 pg/ml. One exceptional value outlier was above the upper level of quantification given by the manufacturer. In order to include this case, its SP level was set to 10,000 pg/ml for the statistical calculations. Fig. 1 shows all measured SP values in 107 available samples within the first 4 hr after arrival in

N. Gruber et al.

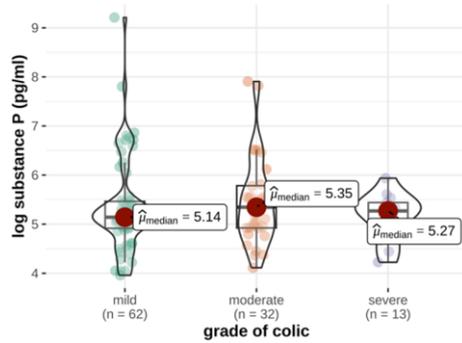


Fig. 1. Log-transformed Substance P values of 30 horses. Samples were repeated hourly up to four times immediately post admission and grouped into mild, moderate, and severe colic groups using the concurrently measured Equine Acute Abdominal Pain Scale. Medians were not different ($P > 0.05$).

the clinic for each of the three different colic groups: mild, moderate, and severe. The measured values were not normally distributed. Blood sampling and EAAPS grading of 30 warmblood horses at one to four timepoints yielded 107 SP values. The horses were divided into the three groups based on their EAAPS grade at up to four time points immediately following admission for colic. The distribution of the numbers of SP values obtained per different group was as follows: 62, 32, and 13 values for the mild, moderate, and severe colic group, respectively (Fig. 1). The median values of the three groups were not different (Fig. 1).

There was neither an association of SP with different pain grades of colic (Table 1) nor with any of the examined established prognostic parameters (cortisol, lactate, and heart rate). Further, individual horses showed a steady SP concentration independent of the sampling timepoint, disease progression, and clinical intervention in the hospitals (e.g., analgesic administration or fluid therapy; Fig. 2).

3.2. Equine Acute Abdominal Pain Scale and established prognostic parameters

3.2.1. EAAPS and cortisol

Horses with severe pain showed significantly higher mean serum cortisol concentration in comparison to horses categorized as mild with EAAPS. There was also a significant increase between horses categorized as mild and moderate (Table 2 and Fig. 3).

3.2.2. EAAPS and blood lactate concentration

Like serum cortisol concentration, blood lactate concentrations were associated with pain grading based on EAAPS. Mild colic patients showed significantly lower mean blood lactate concentrations than severe colic patients. The increase in blood lactate concentration from moderate to severe pain was also significant (Table 3 and Fig. 4).

3.2.3. EAAPS and heart rate

There was a tendency for an increase in median heart rate between mild and severe colic pain groups categorized with EAAPS ($P = 0.07$, Fig. 5).

Table 1
Comparison of substance P values in 30 horses by pain group (mild, moderate and severe colic measured using Equine Acute Abdominal Pain Scale).

Characteristic	Beta	95% CI ¹	P-value
Pain grade between			
moderate - mild	0.04	-0.08, 0.15	0.719
severe - mild	0.11	-0.08, 0.29	0.365
severe - moderate	0.07	-0.10, 0.24	0.614

¹ CI = Confidence Interval

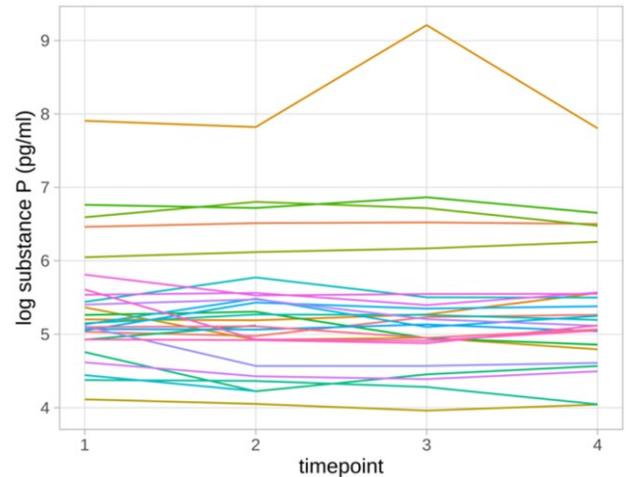


Fig. 2. Substance P concentrations of each horse ($n = 27$) from samples collected hourly up to four times immediately following admission for colic. Each horse is shown in a different color and connected by lines. As three horses only had one sample each, the course of SP values could only be shown for 27 horses.

Table 2

Comparison of serum cortisol values in 30 horses by pain group (mild, moderate and severe colic measured using Equine Acute Abdominal Pain Scale).

Characteristic	Beta	95% CI ¹	P-value
Pain grade between			
Moderate - mild	0.43	0.21, 0.66	<0.001
Severe - mild	0.68	0.37, 0.99	<0.001
Severe - moderate	0.25	-0.07, 0.57	0.170

¹ CI = Confidence Interval

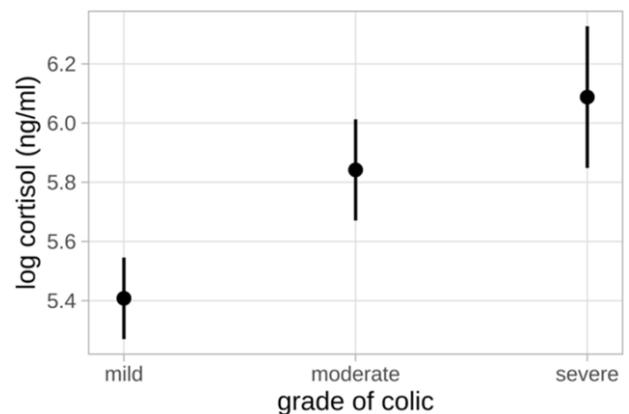


Fig. 3. Estimated marginal mean and standard deviation of serum cortisol concentrations in comparison with pain grading measured by the Equine Acute Abdominal Pain Scale in 30 horses admitted for colic, predicted by generalized robust linear mixed-effects models.

4. Discussion

The results of this study did not support the hypothesis that SP is a reliable biomarker to assess pain in equine colic. Plasma SP concentrations were not clearly associated with EAAPS and, therefore, were not useful as measure of pain intensity. Individual plasma SP concentration was unsuitable as objective prognostic parameter for equine colic outcomes, especially when it comes to prediction of pain. Parameters were

N. Gruber et al.

Table 3
Comparison of blood lactate values in 30 horses by pain group (mild, moderate and severe colic measured using Equine Acute Abdominal Pain Scale).

Characteristic	Beta	95% CI ¹	P-value
Pain grade between			
Moderate - mild	0.09	-0.04, 0.23	0.255
Severe - mild	0.31	0.12, 0.50	<0.001
Severe - moderate	0.22	0.02, 0.41	0.023

¹ CI = Confidence Interval

compared to EAAPS because of the fact that horses with higher pain grades have a worse prognosis [45]. Categorization of colic patients within the EAAPS scale showed significant associations with serum cortisol and blood lactate concentrations. A tendency towards higher values was also visible between the increasing colic grades and the associated heart rate. In contrast, SP did not show any association, neither with EAAPS, nor with any of the established parameters.

The weakness in our study lays in our convenience population. Cases were lost due to treatment with stronger analgesics than allowed according to protocol. By this we probably lost critical numbers of more severely affected horses. Furthermore, from horses with severe colic signs we could not collect a complete time series of samples, since these cases quickly went to surgery or were killed for humane reasons.

The motivation for this study was by observation that SP is a suitable biomarker of pain in studies on cattle [29,31,33,46]. One study analyzed SP in relation to abdominal conditions in cattle by demonstrating significantly greater SP concentrations during parturition than in healthy cows or in cows with uterine torsion [46]. The authors considered whether these findings may be attributed to the tendency of cows with uterine torsion to display milder colic signs, leading to reduced pain and lower SP levels when compared to normal parturition. Additionally, it is worth noting that the cervix is recognized to contain a substantial amount of SP [47]. Similar to intestinal displacements in colic horses, abomasum displacements to the left or to the right can occur in cattle. Sickinger et al. analyzed the SP content of the abomasal wall and found lower concentrations in sick animals than in healthy cattle, assuming that lower SP concentrations led to reduced motility and therefore to displacement.

SP values have not been extensively studied in horses. SP concentrations in equine plasma tended to be lower in the study by Everett et al. [48] on foot pain than in horses with colic. To the best knowledge of the authors, the only study on plasma SP reference values is given by Scholler et al. They reported that the normal SP concentration for warmbloods is between 643 and 8,019 pg/ml, with a mean plasma SP concentration of 2,472 pg/ml [41]. Furthermore, the authors concluded that SP was not suitable to measure stress in horses. Scholler et al. found that values for SP in their reference group of 74 horses was consistent for individual animals, but the interindividual variation was large [41]. In the current study, the colic horses also showed minimal deviation in their individual SP values, but due to the small sample size, these results should be interpreted with caution.

In colic single or combined pathophysiologic effects may release SP. Among these are nociceptive processes and central and local hypovolemia and hypoxemia, and inflammation. In severe colic cases, elevated plasma SP concentrations may come from many release sites. This actually may not hinder the use of SP concentrations as practical predictive factor for colic severity, but as a pure academic measure of pain intensity SP may not be suitable. Moreover, emotional stress may also play in when plasma SP concentrations are increased [49]. Also, many other different components may influence SP values, especially in colic horses as various pathomechanisms are involved simultaneously: stress and pain, acute inflammation, and massive changes regarding the cardiovascular system. SP is also involved in the central regulation of the cardiovascular system as tachykinins represent vasoactive peptides which regulate vascular tone, blood flow, and heart rate through NK1R

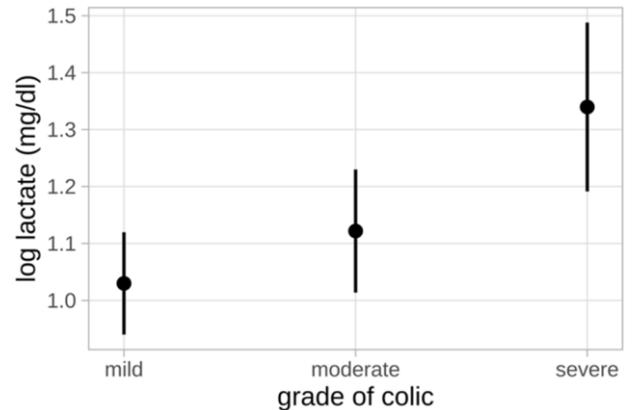


Fig. 4. Estimated marginal mean and standard deviation of blood lactate concentrations in comparison with pain grading measured by the Equine Acute Abdominal Pain Scale in 30 horses admitted for colic, predicted by generalized robust linear mixed-effects models.

depending on the state of the endothelium [26,37,50]. SP and its neurokinin-1 receptor are known to be expressed in many immune cells. Via different paths, SP activates the immune system by inducing inflammation [22]. SP stimulates plasma extravasation and initiates tissue edema and neurogenic inflammation by recruiting inflammatory cells. Souza et al. observed the effects of tachykinins in the amplification of inflammatory responses in rats after initiating ischemia in mesenteric arteries. It was shown that SP increases vascular permeability and neutrophil recruitment following ischemia-reperfusion injury, which also plays an important role in many forms of colic [35]. Further, in colic patients changes in motility of the intestinal tract are common: both hypo- or hypermotility occur. Hypomotility can be a result of decreased SP concentrations because of its role in mediating smooth muscle contractility [51,52]. There are a few studies dealing with SP and its role in the equine gastrointestinal system. A histochemical and immunohistochemical study analyzed the intramural nervous system of equine intestine and showed the presence of SP in almost every intestinal section [34]. Immunoreactivity was detectable in nerve fibers of the tunica mucosa, in nerve cell bodies and nerve fibers of the submucous plexus, and in nerve fibers of the myenteric plexus. The pelvic flexure did not contain any immunoreactive structures and the ilio-cecal valve and

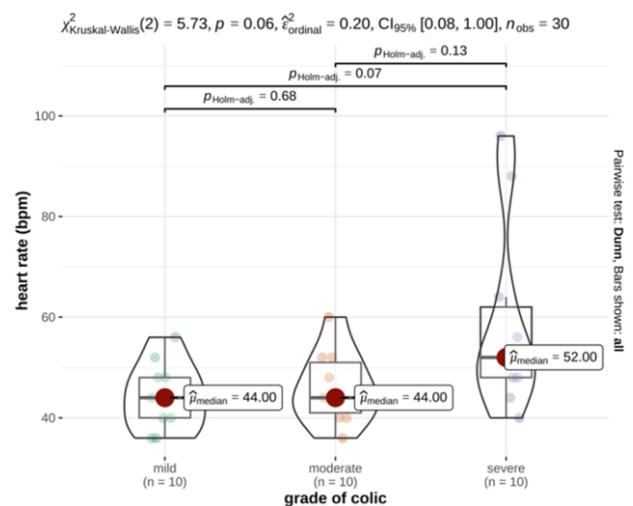


Fig. 5. Median and standard deviation of the heart rate in comparison with pain grading measured by the Equine Acute Abdominal Pain Scale in 30 horses admitted for colic.

N. Gruber et al.

rectum only contained small numbers of immunoreactive nerve fibers. The lower content of SP in the pelvic flexure of horses could be speculated to be the reason for common impactions of this intestinal section [34]. In vitro, SP exhibited the most contractile effects on the circular smooth muscle of the small intestine, and less effects on the large intestinal circular smooth muscle. Overall, the longitudinal muscles from all gut segments were less sensitive to SP [53]. In this context, a change in plasma SP concentrations due to altered intestinal motility in colic patients is conceivable. In addition, SP-immunoreactive nerve fibers were constantly observed in connection to the muscular sheath of blood vessels, intimating the role of SP in the local blood flow [34].

5. Conclusion

In conclusion, plasma SP did not prove to be a reliable and consistent biomarker for pain in horses with colic and did not predict outcome. To determine reference values in healthy horses, basic research is needed. Further research focusing on SP concentrations in defined gastrointestinal diseases should be conducted.

Ethical Statement

Hereby, I Anna May consciously assure that for the manuscript "Evaluation of Substance P as a biomarker for pain in equine colic" the following is fulfilled:

- 1) This material is the authors' own original work, which has not been previously published elsewhere.
- 2) The paper is not currently being considered for publication elsewhere.
- 3) The paper reflects the authors' own research and analysis in a truthful and complete manner.
- 4) The paper properly credits the meaningful contributions of co-authors and co-researchers.
- 5) The results are appropriately placed in the context of prior and existing research.
- 6) All sources used are properly disclosed (correct citation). Literally copying of text must be indicated as such by using quotation marks and giving proper reference.
- 7) All authors have been personally and actively involved in substantial work leading to the paper, and will take public responsibility for its content.
- 8) For all horses included in this study ethical approval was granted by the Ludwig Maximilians University's ethics committee, protocol number: 356-31-03-2023.

CRedit authorship contribution statement

Nina Gruber: Writing – review & editing, Writing – original draft, Resources, Methodology, Investigation, Data curation, Conceptualization. **Stefan Gesell-May:** Methodology, Investigation, Data curation, Conceptualization. **Dominik Scholler:** Writing – original draft, Methodology. **Yury Zablotzki:** Visualization, Software, Formal analysis. **Anna May:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Supervision, Project administration, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Declaration of Competing Interest

None of the authors has any financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

References

- [1] Dybkjaer E, Steffensen KF, Honore ML, Dinesen MA, Christophersen MT, Pihl TH. Short-term survival rates of 1397 horses referred for colic from 2010 to 2018. *Acta Vet Scand* 2022;64:11.
- [2] Tinker MK, White NA, Lessard P, Thatcher CD, Pelzer KD, Davis B, et al. Prospective study of equine colic incidence and mortality. *Equine Vet J* 1997;29:448–53.
- [3] Bishop RC, Gutierrez-Nibeyro SD, Stewart MC, McCoy AM. Performance of predictive models of survival in horses undergoing emergency exploratory laparotomy for colic. *Vet Surg* 2022;51:891–902.
- [4] Iglesias-García M, Rodríguez Hurtado I, Ortiz-Díez G, De la Calle Del Barrio J, Fernández Pérez C, Gómez Lucas R. Predictive models for equine emergency exploratory laparotomy in Spain: Pre-, Intra-, and Post-operative-mortality-associated factors. *Animals (Basel)* 2022:12.
- [5] Bowden A, England GCW, Brennan ML, Mair TS, Furness WA, Freeman SL, et al. Indicators of 'critical' outcomes in 941 horses seen 'out-of-hours' for colic. *Vet Rec* 2020;187:492.
- [6] Dukti S, White NA. Prognosticating equine colic. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2009;25:217–31.
- [7] Smanik LE, Moser DK, Rothers KP, Hackett ES. Serial venous lactate measurement following gastrointestinal surgery in horses. *J Vet Sci* 2022;23:e66.
- [8] Dunkel B, Kapff JE, Naylor RJ, Boston R. Blood lactate concentrations in ponies and miniature horses with gastrointestinal disease. *Equine Vet J* 2013;45:666–70.
- [9] Hinchcliff KW, Rush BR, Farris JW. Evaluation of plasma catecholamine and serum cortisol concentrations in horses with colic. *J Am Vet Med Assoc* 2005;227:276–80.
- [10] Farrell A, Kersh K, Liepman R, Dembek KA. Development of a colic scoring system to predict outcome in horses. *Front Vet Sci* 2021;8:697589.
- [11] Nikvand AA, Jalali SM, Ghadrán Mashhadi A, Razi Jalali M, Hassanpour Amirabadi S. Clinical, hematologic, hemostatic, and serum biochemical findings related to survival in Arabian horses with colic. *Vet Clin Pathol* 2019;48:441–8.
- [12] Kelleher ME, Brosnan RJ, Kass PH, le Jeune SS. Use of physiologic and arterial blood gas variables to predict short-term survival in horses with large colon volvulus. *Vet Surg* 2013;42:107–13.
- [13] Sutton GA, Ertzman-Ginsburg R, Steinman A, Milgram J. Initial investigation of mortality rates and prognostic indicators in horses with colic in Israel: a retrospective study. *Equine Vet J* 2009;41:482–6.
- [14] Scharner D, Bankert J, Brehm W. [Comparison of the findings of rectal examination and ultrasonographic findings in horses with colic]. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 2015;43:278–86.
- [15] Sutton GA, Dahan R, Turner D, Paltiel O. A behaviour-based pain scale for horses with acute colic: scale construction. *Vet J* 2013;196:394–401.
- [16] van Loon JP, van Dierendonck MC. Monitoring acute equine visceral pain with the Equine Utrecht University scale for composite pain assessment (EQUUS-COMPASS) and the equine Utrecht university scale for facial assessment of pain (EQUUS-FAP): a scale-construction study. *Vet J* 2015;206:356–64.
- [17] Gaddum JH, Schild H. Depressor substances in extracts of intestine. *J Physiol* 1934;83:1–14.
- [18] v. Euler US, Gaddum JH. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol* 1931;72:74–87.
- [19] Maggi CA, Patacchini R, Giachetti A, Meli A. Tachykinin receptors in the circular muscle of the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol* 1990;101:996–1000.
- [20] Hunt SP, Mantyh PW. The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:83–91.
- [21] Otsuka M, Konishi S, Takahashi T, Saito K. Substance P and primary afferent transmission. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1976;15:187–91.
- [22] Suvas S. Role of substance P neuropeptide in inflammation, wound healing, and tissue homeostasis. *J Immunol* 2017;199:1543–52.
- [23] Redkiewicz P. The regenerative potential of substance P. *Int J Mol Sci* 2022:23.
- [24] Park SW, Yan YP, Satriotomo I, Vemuganti R, Dempsey RJ. Substance P is a promoter of adult neural progenitor cell proliferation under normal and ischemic conditions. *J Neurosurg* 2007;107:593–9.
- [25] Mashaghi A, Marmalidou A, Tehrani M, Grace PM, Pothoulakis C, Dana R. Neuropeptide substance P and the immune response. *Cell Mol Life Sci* 2016;73:4249–64.
- [26] Mistrova E, Kruzliak P, Chottova Dvorakova M. Role of substance P in the cardiovascular system. *Neuropeptides* 2016;58:41–51.
- [27] Kormos V, Gaszner B. Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans. *Neuropeptides* 2013;47:401–19.
- [28] Ifitkhar K, Siddiq A, Baig SG, Zehra S. Substance P: a neuropeptide involved in the psychopathology of anxiety disorders. *Neuropeptides* 2020;79:101993.
- [29] Tschoner T. Methods for pain assessment in calves and their use for the evaluation of pain during different procedures—a review. *Animals (Basel)* 2021:11.
- [30] Warner R, Kleinhenz MD, Ydstie JA, Schleining JA, Wulf LW, Coetzee JF, et al. Randomized controlled trial comparison of analgesic drugs for control of pain associated with induced lameness in lactating dairy cattle. *J Dairy Sci* 2021;104:2040–55.
- [31] Karlen KJ, Baier FS, Odegard SL, Baumann RM, Coetzee JF, Kehoe SI, et al. Efficacy of oral meloxicam as primary pain mitigation following caustic paste disbudding of three day old Holstein calves(1). *Transl Anim Sci* 2021;5:txz151.
- [32] Tschoner T, Feist M. Substance P concentrations in the blood plasma and serum of adult cattle and calves during different painful procedures and conditions - a systematic review. *BMC Vet Res* 2022;18:232.
- [33] Coetzee JF, Lubbers BV, Toerber SE, Gehring R, Thomson DU, White BJ, et al. Plasma concentrations of substance P and cortisol in beef calves after castration or simulated castration. *Am J Vet Res* 2008;69:751–62.

N. Gruber et al.

- [34] Domeneghini C, Radaelli G, Arrighi S, Bosi G, Dolera M. Cholinergic, nitrenergic and peptidergic (Substance P- and CGRP-utilizing) innervation of the horse intestine. A histochemical and immunohistochemical study. *Histol Histopathol* 2004;19:357–70.
- [35] Souza DG, Mendonça VA, de ACMS, Poole S, Teixeira MM. Role of tachykinin NK receptors on the local and remote injuries following ischaemia and reperfusion of the superior mesenteric artery in the rat. *Br J Pharmacol* 2002;135:303–12.
- [36] Steinhoff MS, von Mentzer B, Geppetti P, Pothoulakis C, Bunnett NW. Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. *Physiol Rev* 2014;94:265–301.
- [37] Feickert M, Burckhardt BB. Substance P in cardiovascular diseases—a bioanalytical review. *Clin Chim Acta* 2019;495:501–6.
- [38] Nakamura Y, Izumi H, Shimizu T, Hisaoka-Nakashima K, Morioka N, Nakata Y. Volume transmission of substance P in striatum induced by intraplantar formalin injection attenuates nociceptive responses via activation of the neurokinin 1 receptor. *J Pharmacol Sci* 2013;121:257–71.
- [39] Busoni V, De Busscher V, Lopez D, Verwilghen D, Cassart D. Evaluation of a protocol for fast localised abdominal sonography of horses (FLASH) admitted for colic. *Vet J* 2011;188:77–82.
- [40] Mosher RA, Coetzee JF, Allen PS, Havel JA, Griffith GR, Wang C. Effects of sample handling methods on substance P concentrations and immunoreactivity in bovine blood samples. *Am J Vet Res* 2014;75:109–16.
- [41] Scholler D, Zablotzki Y, May A. Evaluation of substance P as a new stress parameter in horses in a stress model involving four different stress levels. *Animals (Basel)* 2023;13.
- [42] Bennett-Wimbush K, SB J, Amstutz M, Duthie M. Effects of Overcheck use on stress parameters and welfare implications in driving horses. *J Appl Anim Welf Sci* 2020;23:83–94.
- [43] Sutton GA, Bar L. Refinement and revalidation of the equine acute abdominal pain scale (EAAPS). *Isr. J. Vet. Med.* 2016;71(1):15–23.
- [44] Maskato Y, Dugdale A, Singer E, Kelmer G, Sutton G. Prospective Feasibility and revalidation of the equine acute abdominal pain scale (EAAPS) in clinical cases of colic in horses. *Animals* 2020;10:2242.
- [45] Proudman CJ, Dugdale AH, Senior JM, Edwards GB, Smith JE, Leuwer ML, et al. Pre-operative and anaesthesia-related risk factors for mortality in equine colic cases. *Vet J* 2006;171:89–97.
- [46] Sickinger M, Roth J, Failing K, Wehrend A. Serum neuropeptide concentrations in cows with intrapartum uterine torsion. *Anim Reprod Sci* 2018;196:193–6.
- [47] Patak EN, Pennefather JN, Story ME. Effects of tachykinins on uterine smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000;27:922–7.
- [48] Everett JB, Schumacher J, Doherty TJ, Black RA, Amelse LL, Krawczel P, et al. Effects of stacked wedge pads and chains applied to the forefeet of Tennessee Walking Horses for a five-day period on behavioral and biochemical indicators of pain, stress, and inflammation. *Am J Vet Res* 2018;79:21–32.
- [49] Hernández-Avalos I, Mota-Rojas D, Mendoza-Flores JE, Casas-Alvarado A, Flores-Padilla K, Miranda-Cortes AE, et al. Nociceptive pain and anxiety in equines: Physiological and behavioral alterations. *Vet World* 2021;14:2984–95.
- [50] Walsh DA, D FM. Tachykinins and the cardiovascular system. *Curr Drug Targets* 2006;7:1031–42.
- [51] Malone ED, Kannan MS, Brown DR. Evaluation of substance P as a neurotransmitter in equine jejunum. *Am J Vet Res* 2000;61:1178–84.
- [52] Schmidt PT, Holst JJ. Tachykinins in regulation of gastric motility and secretion. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:579–88.
- [53] Belloli C, Arioli F, Beretta C, Madonna M. In vitro effects of tachykinins on the smooth musculature of horse gut. *J Vet Pharmacol Ther* 1994;17:379–83.

IV. ERWEITERTE DISKUSSION

Objektive Schmerzbeurteilung & Equine Acute Abdominal Pain Scale

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden immer mehr wissenschaftliche Studien zur objektiveren und zuverlässigeren Bewertung von Schmerzen bei Pferden durchgeführt. Das wachsende Interesse kann einerseits auf die Fortschritte der Medizin, andererseits auf das zunehmende Bestreben zurückgeführt werden, die Patienten bestmöglich mit Schmerzmitteln zu behandeln (Ashley et al. 2005, de Grauw & van Loon 2016, van Loon & van Dierendonck 2018). Die Einschätzung des Schmerzgrades bei Pferden variiert bekanntlich zwischen Besitzern und Tierärzten (Sellon et al. 2022). Verschiedene Parameter und Schmerzskalen sollen die Objektivität und die Vergleichbarkeit von Schmerzen bei Pferden verbessern, wobei es dabei mehrere Herausforderungen gibt. Eine davon besteht darin, dass die Wahrnehmung und die Äußerung von Schmerzen individuell variieren. Zusätzlich kommunizieren Pferde auf ganz andere Weise als der Mensch (Wagner 2010, Raja et al. 2020). Feine Veränderungen in der Mimik wie Anspannungen im Bereich des Mauls und Kinns können manchmal das einzige Anzeichen sein, das Pferde mit Schmerzen offenbaren. Auf dieser Grundlage wurde das sogenannte Schmerzgesicht bei Pferden und auch bei anderen Tierarten vielfach analysiert (s. aufgeführte Schmerzskalen Abschnitt II.2.3.) (Dalla Costa et al. 2014, Glerup et al. 2015, Evangelista et al. 2022). Das Ergebnis sind präzise Beschreibungen von Merkmalen, wie sie zum Beispiel bei der HGS vorkommen. Diese können Schritt für Schritt bewertet werden (Dalla Costa et al. 2014). Dabei sind diese universellen, auf verschiedene Arten von Schmerzen anwendbaren Methoden für den praktischen Alltag in großen Kliniken mit vielen Tierärztinnen und Tierärzten besonders wertvoll (van Loon & van Dierendonck 2018). Eine wichtige Voraussetzung, um diese Modelle anwenden zu können, sind fundierte Kenntnisse des Verhaltens und der Physiologie von Pferden (Taylor et al. 2002, Wagner 2010). In einer Studie zur HGS konnte gezeigt werden, dass Personen ohne Pferdeerfahrung selbst nach einem 30-minütigen Training nicht in der Lage waren, Schmerzen durch die Skala korrekt zu analysieren (Dai et al. 2020). Durch die Anwendung von verschiedenen Methoden in klinischen Situationen können Pferdetierärzte und auch Besitzer ihre Fähigkeiten verbessern, Schmerzen bei Pferden zu erkennen und daraufhin notwendige Schritte einzuleiten. Darüber hinaus kann die Kommunikation über

objektive Skalen hilfreich sein, um Symptome vergleichbar zu bewerten und zu verstehen (Wagner 2010, Sellon et al. 2022).

Eine weitere Schwierigkeit in der Beurteilung von Schmerzen stellen die vielen unterschiedlichen Facetten der Physiologie und besonders der Pathophysiologie dar. Allein der Symptomenkomplex des akuten Abdomens kann zahlreiche Ursachen und Erscheinungsbilder haben (s. verschiedene Kolikformen Abschnitt II.1.4.). Hinzu kommt, dass die Abgrenzung von Schmerzsymptomen zu Stress, Angst und Aufregung unter anderem durch das individuelle Temperament der Tiere herausfordernd sein kann (Hernández-Avalos et al. 2021). Die physiologischen Reaktionen des Körpers auf diese Reize (Schmerz, Stress, Angst und Aufregung) sind eng miteinander verknüpft und bedingen sich gegenseitig (Hector & Mama 2018, Hernández-Avalos et al. 2021). Daher sind einige einzelne Parameter, vor allem die physiologischen und endokrinologischen, nicht schmerzspezifisch und sollten idealerweise mit verhaltensbasierten Skalen kombiniert werden (Ashley et al. 2005, van Dierendonck & van Loon 2016).

Eine auf Verhalten basierende Skala ist die EAAPS. Sie wurde in der vorliegenden Studie zur Evaluation von SP als Prognoseparameter für Kolikpatienten ausgewählt, da sie spezifisch für abdominale Schmerzen entwickelt wurde (genaue Beschreibung s. Abschnitt II.2.3.) (Sutton et al. 2013). Im Vergleich zu anderen Skalen wie der EAAPS-2 oder der EQUUS-COMPASS, ist die EAAPS schnell und einfach durchführbar. Sie hat sich als zuverlässige Bewertungsmethode bewährt und wurde bereits in vorhergehenden Studien zur Untersuchung von neuen Parametern verwendet (Sutton et al. 2013, Contreras-Aguilar et al. 2018, Sutton et al. 2019, Maskato et al. 2020). Die Einstufung mit einem Score von 0 (keine Koliksymptome) bis 5 (starke Koliksymptome) wurde in der vorliegenden Studie zeitgleich mit den vier Zeitpunkten vorgenommen, an denen die Blutproben entnommen wurden. Die Proben wurden bei Einlieferung der Pferde, sowie drei weitere Male im Abstand von je einer Stunde abgenommen. Wenn ein Pferd mehrere Koliksymptome zeigte, wurde das jeweils schwerwiegendste Symptom erfasst. Um die Darstellung und das Verständnis der Ergebnisse zu erleichtern, wurden die Scores in die medizinisch geläufigeren Begriffe gering-, mittel- und hochgradig übersetzt (s. Abschnitt III.3.).

Neben SP und AA wurden die bereits etablierten Parameter für Kolik, Stress und

Schmerz bei Pferden, Cortisol, Laktat und Herzfrequenz, zeitgleich mit der EAAPS analysiert. Der Zusammenhang von Cortisol und Laktat mit dem jeweiligen Kolikgrad war signifikant. Die Herzfrequenz zeigte zwar keine statistisch signifikante Verbindung zu den Koliksymptomen, wies jedoch eine Tendenz zwischen Patienten mit geringem und hohem Kolikgrad auf (s. Abschnitt III.3.). Diese Ergebnisse bestätigten sowohl die Angaben in der Literatur zu den bekannten Prognose- und Stressparametern (s. Abschnitt II.1.5.) als auch die Effektivität und Übereinstimmung der EAAPS mit den gezeigten Symptomen der Pferde. Insgesamt erschienen damit der Aufbau und die Durchführung der Studie als ausreichend, um die neuen Biomarker SP und AA als Stress- und Schmerzparameter bei Kolikpatienten zu prüfen.

Substanz P

Die Vielzahl an Publikationen zeigt, dass der Neurotransmitter SP schon seit einiger Zeit im Fokus der human- und tiermedizinischen Forschung steht (s. Abschnitt II.3.2.). Trotzdem eröffnen sich immer noch neue Gebiete, in denen die Substanz eine Rolle spielt. In der Rindermedizin ist die SP in Kombination mit Cortisol ein häufig verwendeter Parameter für Stress und Schmerz und wird vor allem in Studien eingesetzt, die den Tierschutz betreffen (Tschoner 2021). Es wurden mittlerweile zahlreiche Studien durchgeführt, welche jedoch zu heterogenen Ergebnissen in Bezug auf SP als Biomarker für Schmerzen geführt haben (Tschoner & Feist 2022). Zum Beispiel wurden bereits etwa 25 Artikel zu Kastrationen und der Enthornung von Kälbern veröffentlicht und einige Untersuchungen von SP bei Milchkühen angefertigt, um die Wirkung von Analgetika bei bestimmten Schmerzzuständen zu überprüfen. In einigen Studien erschien SP als zuverlässiger Parameter, in anderen Studien konnten keine Unterschiede zwischen SP-Werten bei Tieren mit und ohne Schmerzen festgestellt werden (Coetzee et al. 2008, Olson et al. 2016, Kleinhenz et al. 2019, Karlen et al. 2021, Warner et al. 2021, Tschoner & Feist 2022). Die genaue Ursache hierfür ist bislang noch nicht sicher geklärt, eine mögliche Erklärung könnte im unterschiedlichen Aufbau der Studien liegen (Tschoner & Feist 2022). Eine weitere mögliche Begründung besteht darin, dass SP von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird, welche schwer zu überblicken und voneinander zu trennen sind (Warner et al. 2021). Verschiedene Einflüsse werden im Verlauf dieses Abschnitts diskutiert.

Im Gegensatz zu Rindern sind die Untersuchungen beim Pferd bisher limitiert und der Zusammenhang mit abdominalen Schmerzen unerforscht. Anhand mehrerer detailreicher immunohistochemischer Studien zum intramuralen Nervensystem im Darmtrakt von Pferden wurde die bedeutende Rolle von SP als Modulator der glatten Muskulatur dargelegt (Malone et al. 2000, Domeneghini et al. 2004). SP konnte in fast jedem Darmabschnitt, insbesondere in den Nervenfasern der Tunica mucosa, in den Nervenzellkörpern und -fasern des Plexus submucosus und des Plexus myentericus nachgewiesen werden. Die höchsten kontraktile Effekte scheint SP auf die zirkuläre, glatte Muskulatur des Dünndarms zu haben. Darüber hinaus wurden SP-immunreaktive Nervenfasern in der Tunica media, also im Bereich der glatten Muskelzellen der Gefäßwände beobachtet (Domeneghini et al. 2004). Angesichts der oben genannten Gründe und der Notwendigkeit einer objektiveren und messbaren Bewertung von Schmerzen bei Pferden lag es nahe, den Biomarker SP bei Pferden mit Kolik zu untersuchen.

In der Voruntersuchung führten insgesamt sehr inhomogene Werte (447,0 bis über 10.000 pg/ml, s. Tabelle 4, Abschnitt III.2.1.) und einige Ausreißer zu hohen Standardabweichungen (s. Tabelle 5, Abschnitt III.2.1.). Die Betrachtung der Medianwerte (geringgradig 803,6 pg/ml, mittelgradig 1626,5 pg/ml, hochgradig 2006,5 pg/ml) ließ einen möglichen Zusammenhang zwischen den SP-Konzentrationen und den Kolikgraden vermuten. Statistisch ergab sich insgesamt eine mittlere Korrelation zwischen SP und dem Kolikgrad. Bemerkenswert war, dass die SP-Konzentrationen im Gegensatz zu anderen Arten deutlich höher angesiedelt waren. Die Werte von gesunden Menschen werden zum Beispiel im Durchschnitt mit 65 pg/ml angegeben und die von Milchkühen mit $0,25 \pm 0,09$ ng/ml ($=250 \pm 90$ pg/ml) (Wang et al. 2012, Rodriguez et al. 2018).

Die Angaben in der Literatur beschreiben, dass die Probenbearbeitung von SP aus unterschiedlichen Gründen schwierig und fehleranfällig ist (s. Abschnitt II.3.2., *Methodik und Werte von Substanz P*) (Mosher et al. 2014, Tschoner & Feist 2022). Wie im Folgenden beschrieben, wurde daher die Methodik und Analyse der folgenden Studie im Vergleich zur Voruntersuchung optimiert. Die Untersuchung einer Dissertation zu Labmagenverlagerungen beim Rind brachte hervor, dass unterschiedlich hohe SP-Gehalte in Gewebeproben bei verschiedenen Rassen möglich sind (Sickinger 2007). Da diesbezüglich beim Pferd keine Informationen vorliegen, wurden in der folgenden Studie nur die Rasse „Warmblutpferd“

einbezogen. Es ist bekannt, dass die SP-Konzentrationen in anderen Spezies je nach Alter variieren kann, daher wurden nur adulte Tiere zwischen drei und 20 Jahren in die Studie aufgenommen (Wong et al. 2010, Dockweiler et al. 2013). Schmerzen werden bekanntlich durch die Behandlung mit Analgetika gedämpft, folglich wurden Kriterien für die Vorbehandlung mit typischen Kolikmedikamenten festgelegt. Es wurden nur Pferde berücksichtigt, welche gar nicht oder einmalig mit milden, kurzwirksamen Medikamenten (Butylscopolamin, Metamizol, Xylazin) therapiert wurden. Da sich in anderen Studien die Messung des Krankheitsverlaufs als nützlich dargestellt hat, wurden von jedem Pferd vier statt nur einer Blutprobe entnommen (Everett et al. 2018, Barragan et al. 2020). Wie unter Abschnitt II.3.2., *Methodik und Werte von Substanz P* beschrieben, ist SP im Blut nicht lange stabil und wird ungekühlt schnell abgebaut (Mosher et al. 2014). Daher wurden die SP-Plasmaproben bei der Studie im Gegensatz zur Voruntersuchung innerhalb von 15 Minuten nach Entnahme zentrifugiert, in ein Eppendorf-Röhrchen pipettiert und bei -20 °C eingefroren. Des Weiteren wurden im Vergleich zur Voruntersuchung die Einschlusskriterien der Patienten eingegrenzt, sowie die Durchführung und Probenbearbeitung verfeinert.

In der Studie sollte evaluiert werden, ob sich SP beim Pferd als Stress- und Schmerzparameter und darüber hinaus als Prognoseparameter bei Kolik eignet. Die Hypothese war, dass SP gemeinsam mit dem Kolikgrad bei Pferden mit akutem Abdomen ansteigt. Im Gegensatz zu den etablierten Parametern Cortisol, Laktat und der Herzfrequenz zeigte SP keinerlei Zusammenhang mit den Kolikgraden. Die Hypothese konnte demnach nicht bestätigt werden. Daneben konnte auch keine Verbindung zwischen SP und den etablierten Parametern festgestellt werden. Insgesamt zeigten sich wieder inhomogene, teils hohe SP-Konzentrationen. Die Werte variierten zwischen 52,5 und über 10.000,0 pg/ml (s. Tabelle 6, Abschnitt III.2.1.). Die Standardabweichungen waren im Vergleich zur Voruntersuchung vermindert, was durch die verbesserte Durchführung bedingt sein könnte. Auch die Medianwerte der drei Kolikgrade bewegten sich in einem kleineren Rahmen zwischen 171,0 und 212,1 pg/ml.

Eine jüngere Studie einer Forschungsgruppe veröffentlichte erstmals Referenzwerte für Warmblutpferde (Scholler et al. 2023). Die Spannweite der Normalwerte reichte dabei von 643 bis 8019 pg/ml, wobei der Durchschnitt bei 2472 pg/ml lag. Das Ziel dieser Studie war es, SP als Parameter für emotionalen

Stress bei Pferden zu untersuchen, da bei Menschen und Ratten unter Angst und psychischem Stress erhöhte SP-Werte dokumentiert wurden (Ebner et al. 2004, Ebner & Singewald 2006, Ebner et al. 2008). In dem angewandten vierstufigen Stressmodell von Scholler et al. konnten keine signifikanten Korrelationen aufgezeichnet werden, wobei die Autoren vermuteten, dass die verwendeten Stressoren möglicherweise nicht groß genug waren. Die SP-Konzentrationen der aktuellen Studie liegen im Allgemeinen im Bereich der Referenzwerte von Scholler et al., wobei jedoch auch einige niedrigere und höhere Werte bei den Kolikpatienten gemessen wurden. An dieser Stelle soll nochmals erwähnt werden, dass der Vergleich von SP-Werten zwischen verschiedenen Studien nicht empfohlen wird (Feickert & Burckhardt 2019, Tschoner & Feist 2022). Folglich sollte die Bewertung von erhöhten oder erniedrigten SP-Werten bei Kolikpatienten gegenüber den Referenzwerten von Scholler et al. mit Vorsicht erfolgen. Darüber hinaus ist es möglich, dass die Werte der Kolikpatienten durch emotionalen Stress beeinflusst wurden. Schmerzen verursachen bei Fluchttieren emotionalen Stress, welcher den SP-Gehalt im Blut beeinflussen kann (Bondy et al. 2003, Hernández-Avalos et al. 2021). Die einzige andere Studie zu SP-Messung im Plasma von Pferden wurde 2018 von Everett et al. veröffentlicht (Everett et al. 2018). Dabei wurden die Auswirkungen auf Schmerz, Stress und Entzündung von an den Vorderhufen angebrachten gewichtigen Keilen und Ketten bei Tennessee Walking Horses untersucht. Die biochemischen Parameter SP, Cortisol und Fibrinogen zeigten in dieser Studie keine signifikante Veränderung. Hier zeigten sich die SP-Werte der Kontrollgruppe bei $91,8 \pm 6,9$ pg/ml und die der behandelten Pferde bei $74,4 \pm 6,9$ pg/ml. Die weitaus niedrigeren SP-Konzentrationen als in den anderen beiden Studien (Stressmodell und Kolikpatienten) ist hier vermutlich auch durch unterschiedliche Probenbearbeitung und die Verwendung eines anderen ELISAs zurückzuführen. Es wurde, wie in der vorliegenden Studie, ein kompetitiver ELISA, jedoch von einer anderen Firma (SP Correlate-EIA, -CLIA ELISA kits, catalogue No. 9000-018, Assay Designs Inc, Ann Arbor, Michigan) eingesetzt. Dieser wurde bereits in anderen Studien mit Rindern beschrieben (Coetzee et al. 2008). Die Verwendung verschiedener Analysemethoden sind relevant, da die Variabilität der SP-Spiegel durch Kreuzreaktivität mit anderen Metaboliten von SP und die unterschiedliche Selektivität der verwendeten Antikörper des jeweiligen ELISA Kits bedingt sein kann (Ganjwale & Cowsik 2015, Feickert & Burckhardt 2019).

Da bei Koliken viele Pathomechanismen gleichzeitig und auch dynamisch ablaufen, gibt es einige Faktoren, die SP beeinflussen können. Die pathophysiologischen Vorgänge und Verläufe sind bei jeder Kolikerkrankung und jedem Patienten individuell (Bondy et al. 2003, Hernández-Avalos et al. 2021). Die Pferde der Studie waren an unterschiedlichen Kolikformen erkrankt. Verschiedene Kolikformen führen unterschiedliche Pathomechanismen mit sich. Bei einer Strangulation des Dünndarms beispielsweise werden Anteile des Darms abgeschnürt, es kommt zur Ischämie. Die Folge sind akute entzündliche Prozesse, welche über den Weg der neurogenen Entzündung von SP beeinflusst werden. Es hat sich gezeigt, dass Tachykinine die Entzündungsreaktion nach experimentellem Einleiten einer Ischämie der Mesenterialarterien bei Ratten verstärken (Souza et al. 2002). SP aktiviert als Neuropeptid Teile des Immunsystems und kann Endothelabhängig die vaskuläre Permeabilität erhöhen und Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten anlocken (Steinhoff et al. 2014, Suvas 2017). Als vasoaktive Peptide regulieren Tachykinine über den NK1-Rezeptor den Gefäßtonus und den Blutfluss. Bereits v. Euler und Gaddum konnten die Vasodilatation unter dem Einfluss von SP beobachten (v. Euler & Gaddum 1931, Walsh & D 2006). Hinzu kommt, dass SP an der Modulation der Herzfrequenz beteiligt ist (Mistrova et al. 2016, Feickert & Burckhardt 2019). Die ausgedehnte Belastung des Herz-Kreislauf-Systems bei den meisten Kolikerkrankungen ist ein weiterer Faktor, der den SP-Spiegel beeinflussen kann. Daneben sind Hyper- oder Hypomotilität des Darms als Begleiterscheinungen verschiedener Kolikformen relevant, da SP bekanntlich die Kontraktilität der glatten Muskulatur moduliert (Domeneghini et al. 2004). Von besonderem Interesse im Hinblick auf weitere Studien wäre es, Gewebeproben der Darmwand von Kolikpatienten immunhistochemisch zu untersuchen und mit gesunden Pferden zu vergleichen, ähnlich zur Studie von Sickinger et al. bei Labmagenverlagerungen beim Rind (Sickinger 2007).

Da SP in all diese aufgeführten physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge des Körpers involviert ist (s. Abschnitt II.3.2.), wird der SP-Gehalt im Blut durch eine Vielzahl an Faktoren beeinflusst. Infolgedessen ist die Beurteilung von SP insgesamt komplex und erklärt möglicherweise auch die große Spannweite der SP-Konzentrationen.

Gleichzeitig konnte in der Studie beobachtet werden, dass die individuellen SP-Werte eines Pferdes im Verlauf der Untersuchung und Behandlung verhältnismäßig

konstant blieben. Unabhängig von der Verabreichung von Analgetika, Antiphlogistika, Sedativa, Spasmolytika oder Prokinetika wiesen die SP-Konzentrationen im Zeitverlauf bei den einzelnen Pferden kaum Veränderungen auf (s. Abbildung 2 der Publikation, Abschnitt III.3.). Auch Infusions- oder Bewegungstherapie hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Werte. In der Studie von Scholler et al. wurde ein ähnliches Verhalten beobachtet (Scholler et al. 2023). Wäre SP im Plasma von Pferden ein geeigneter Parameter zur Schmerzerkennung, würde man hingegen erwarten, dass der Wert nach Gabe von Schmerzmitteln sinkt.

Zusammenfassend hat sich Plasma-SP in dieser Studie nicht als zuverlässiger Parameter für Schmerzen und Stress bei Kolikpatienten erwiesen. Die heterogenen Studienergebnisse im Bereich der Rindermedizin können angesichts der Studienlage bei Pferden nachvollzogen werden. Es stellt sich die Frage, ob es in Anbetracht der unterschiedlichen SP-Werte in den Studien bei verschiedenen Tierarten überhaupt möglich ist, sinnvolle und konsistente Referenzwerte für SP zu erstellen. Kontrollgruppen sind in wissenschaftlichen Studien ohnehin etabliert, wohl aber bei SP von betonter Wichtigkeit. Die zusammengetragenen Erkenntnisse der Literatur machen deutlich, dass noch viel Grundlagenforschung zu SP geleistet werden sollte. Hierzu wäre es förderlich, den Aufbau von zukünftigen Studien noch weiter einzugrenzen, um Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Funktionen von SP voneinander trennen zu können. Zum Beispiel könnten weitere Untersuchungen mit gesunden Tieren durchgeführt werden, um eine einheitliche, standardisierte Methodik für die SP zu entwickeln. So könnte geprüft werden, ob möglicherweise doch Referenzwerte etabliert werden können. Unter definierten Schmerzmodellen könnte weiter analysiert werden, ob SP vor allem durch Nozizeption beeinflusst wird oder inwieweit der Parameter sich auch durch Stress und Entzündung verändert.

Alpha-Amylase

Die AA reflektiert als ein Biomarker für physiologischen und psychologischen Stress die Aktivität des autonomen Nervensystems. Das autonome Nervensystem ist neben der HPA-Achse eines der beiden großen Stressreaktionssysteme des Körpers (Fuentes et al. 2011, Fuentes-Rubio et al. 2016, Skoluda et al. 2017). Beide Systeme sind unabhängig voneinander und werden unterschiedlich aktiviert. Um Differenzen in der Stressreaktion eines Individuums analysieren zu können, macht es folglich Sinn, Cortisol und AA gemeinsam zu bestimmen (Tecles et al. 2014).

Da Contreras-Aguilar et al. eine signifikante Korrelation von Speichel-AA-Aktivität mit der EAAPS-1 bei Pferden mit akutem Abdomen entdeckten, sollte in der aktuellen Studie evaluiert werden, ob AA aus dem Serum ebenfalls mit der Schmerzskala bei abdominalen Schmerzen in Verbindung steht (Contreras-Aguilar et al. 2018, Contreras-Aguilar et al. 2019). Schon früher wurde der Verdacht geäußert, dass erhöhte Amylase- und Lipase-Werte auch durch intestinale Erkrankungen entstehen können (Parry & Crisman 1991).

In der Voruntersuchung variierten die Konzentrationen der Serum-AA stark: von 0 bis 1.226,3 U/l (s. Tabelle 7, Abschnitt III.2.2.). Von den insgesamt 67 Proben lagen allerdings nur sechs über 100 U/l und nur der höchste Wert über 1000 U/l. Der Median aller Patienten lag hingegen in einem kleinen Bereich von 4,2 bis 4,7 U/l. Der Mittelwert stieg jedoch mit der Schwere der Erkrankung an: Patienten mit geringgradigen Koliksymptomen 8,7 U/l, Patienten mit mittelgradigen Koliksymptomen 42,1 U/l und Patienten mit hochgradigen Koliksymptomen 97,9 U/l. Die hohe Standardabweichung führte trotzdem nur zu einer geringen Korrelation zwischen den AA-Werten und den Kolikgraden. Sowohl der niedrigste als auch der höchste Wert wurden bei als hochgradig eingestuften Kolikpatienten gemessen. Die daraus resultierende Hypothese für die folgende Studie lautete, dass Serum-AA bei Pferden mit Kolik sowohl sehr niedrig als auch sehr hoch sein kann. Ein niedriger Wert kann dabei eine Kolikerkrankung zwar nicht ausschließen, aber hohe AA-Werte können hilfreich für die Bestimmung von Stress durch starke abdominale Schmerzen sein.

In der vorliegenden Studie lagen die AA-Werte zwischen 3,0 und 95,7 U/l (s. Tabelle 8, Abschnitt III.2.2.). Die Ergebnisse präsentierten sich beständiger und es traten keine hohen Ausreißer auf. Dies könnte Folge der optimierten Methodik im

Vergleich zur Voruntersuchung sein. Neben einer schnelleren und verbesserten Probenbearbeitung wurden außerdem nur noch Warmblutpferde im Alter von 3-20 Jahren mit einer einheitlichen Vorbehandlung in die Studie einbezogen.

Erneut wurden ein niedriger, sowie der höchste Wert bei als hochgradig eingestuften Patienten analysiert. Allerdings konnten auch bei zwei als geringgradig eingestuften Patienten höhere Serum-AA-Werte festgestellt werden. Zudem trat erneut eine hohe Standardabweichung auf und es konnte daher keine signifikante Korrelation zwischen dem Kolikgrad und der AA ermittelt werden.

Darüberhinaus bestand kein messbarer Zusammenhang zwischen AA und SP, Cortisol oder mit der Herzfrequenz. Indessen konnte ein signifikanter Zusammenhang zu Laktat, einem der wichtigsten Prognoseparameter bei abdominalen Schmerzen, herausgestellt werden (Farrell et al. 2021, Bishop et al. 2022). Bei höherer AA wurden auch höhere Laktatwerte ermittelt (s. Abbildung 2, Abschnitt III.2.2.). In der Studie von Contreras et al. bei abdominalen Schmerzen konnte keine Verbindung zwischen der Speichel-AA und Laktat hergestellt werden (Contreras-Aguilar et al. 2018). Dennoch sind die Ergebnisse der aktuellen Studie plausibel, da beide Parameter als Reaktion auf Stress ansteigen können. Alpha Amylase gilt dabei als Indikator eines aktiven autonomen Nervensystems und Laktat als Endprodukt von anaerober Glykolyse, die in Folge von Hypoxie stattfindet (De Backer 2003, Tecles et al. 2014). Für Gewebhypoxien gibt es verschiedene Ursachen, wobei die Hypoperfusion beim Kolikpatienten durch Strangulationen des Darms hervorgerufen werden kann (De Backer 2003, Smanik et al. 2022). Der gleichzeitige Anstieg von Speichel-AA und Blut-Laktat unter körperlicher Belastung wurde unter anderem bereits bei Menschen und Pferden belegt (Allen 2014, Contreras-Aguilar et al. 2021).

Insgesamt konnte die Hypothese nicht bestätigt werden, da kein konstanter Zusammenhang zwischen dem Grad der Kolik und Serum-AA nachgewiesen werden konnte. Da hohe Werte auch bei geringgradigen Kolikpatienten auftraten, können diese auch nicht sicher als Parameter für Stress durch starke abdominale Schmerzen gewertet werden. Serum-AA könnte jedoch nach weiteren Untersuchungen in anderen Kontexten eventuell ein hilfreicher Biomarker für Stress bei Pferden sein.

Limitationen der Studie

Als eine bedeutende Limitation der Studie ist die begrenzte Zahl der untersuchten Pferde zu sehen. Rückschlüsse auf Zusammenhänge zwischen den Biomarkern SP und AA und dem Ausgang der Erkrankung des jeweiligen Patienten (Prognose) konnten in der aktuellen Studie nicht gezogen werden, da die Patientenzahl zu gering war. Die Analyse von SP ist mit hohen Kosten verbunden, daher konnten nicht unbegrenzt viele Messungen und Patienten in die Studie einbezogen werden.

Im Rahmen der Studie mussten insgesamt nur vier Pferde euthanasiert werden. Zusätzlich ist zu beachten, dass bei den hochgradigen Patienten nie alle vier Proben genommen werden konnten, da sie kurze Zeit nach Einlieferung entweder operiert oder euthanasiert werden mussten.

Da die Referenzwerte anderer Studien, wie bereits begründet, nur bedingt für die Interpretation der Patientenwerte herangezogen werden können, ist die Absenz einer Kontrollgruppe limitierend. Ideal wäre es, eine Gruppe von gesunden Pferden einzubeziehen, welche nach Transport und Anlieferung in einer Pferdeklinik ebenfalls viermal stündlich beprobt wird. Im Gegensatz zur parallelen Entnahme von Blutproben mit gleichzeitiger Kontrolle der Routine-Koliklaborwerte aus einem Venenkatheter wie in der vorliegenden Studie, wäre eine Punktion zur Probenentnahme nur zu Studienzwecken ein genehmigungspflichtiger Tierversuch.

Schlussfolgerung

In der vorliegenden Studie konnten weder Substanz P noch Alpha-Amylase als verlässliche Indikatoren für Stress und Schmerzen bei Pferden mit Kolik evaluiert werden. Für beide Biomarker könnten zukünftige Grundlagenforschungen mit klar definierten und standardisierten Bedingungen und größerer Tierzahl von hohem Wert sein, um mögliche Einflussfaktoren der Parameter feststellen und differenzieren zu können.

V. ZUSAMMENFASSUNG

“The greatness of a nation and its moral progress can be judged by the way its animals are treated” – Mahatma Gandhi.

Dieses Zitat wird im Zusammenhang mit dem Tierschutz immer wieder aufgegriffen. Das Tierwohl steht in der Tiermedizin an oberster Stelle. Dies wird durch eine Vielzahl an Studien widerspiegelt, die das Ziel haben, die optimale Versorgung der Patienten zu gewährleisten und weitere Fortschritte in der Pferdemedizin zu erzielen. Kolik ist nach wie vor eine der häufigsten Erkrankungen und schwerwiegendsten Notfälle in der Pferdepraxis. Die schnelle und frühzeitige Einschätzung und objektive Bewertung eines Patienten spielen eine zentrale Rolle für Tierärzte und Tierbesitzer. Die auftretenden abdominalen Schmerzen korrelieren mit der Schwere der Erkrankung und der Prognose. Da Pferde Fluchttiere sind, zeigen sie häufig nur sehr dezente Schmerzäußerungen, was die Beurteilung von Schmerzen erschweren kann. Hinzu kommt, dass die individuelle Schmerzwahrnehmung und -äußerung bei Pferden stark variieren kann. Es sind bereits einige Schmerzskalen zur Beurteilung von Patienten vorhanden, jedoch ist noch kein isolierter, schmerzspezifischer Biomarker bekannt. Einzelne, aussagekräftige Parameter könnten von großem Wert sein, um Kolikpatienten adäquat zu therapieren und damit das Tierwohl zu verbessern.

Ziel der vorliegenden Studie war die Evaluation der beiden Biomarker Substanz P und Alpha-Amylase in Kombination mit Cortisol als Stress- beziehungsweise Schmerzparameter bei Kolikpatienten. Bei dreißig Patienten wurden nach Einlieferung in eine Pferdeklunik aufgrund von Koliksymptomen vier Blutproben im Abstand von je einer Stunde entnommen. Parallel wurden die Pferde mithilfe der Schmerzskala Equine Acute Abdominal Pain Scale (Sutton & Bar 2016) in die drei Kolikgrade gering-, mittel- und hochgradig eingeteilt. Darüber hinaus wurden die bereits etablierten Parameter Laktat und Herzfrequenz mit den neuen Biomarkern und den Kolikgraden verglichen. Die Hypothese der Studie war, dass Substanz P gemeinsam mit dem Kolikgrad bei Pferden mit akutem Abdomen ansteigt. In der Voruntersuchung von Alpha-Amylase-Konzentrationen stellte sich heraus, dass bei Pferden mit Kolik sowohl niedrige als auch sehr hohe Werte gemessen werden können. Daher wurde für die Studie die Hypothese aufgestellt,

dass ein niedriger Wert eine Kolikerkrankung zwar nicht ausschließen kann, aber hohe Alpha-Amylasewerte zu Bestimmung von Stress durch starke abdominale Schmerzen hilfreich sein können. Der statistisch signifikante Zusammenhang zwischen den etablierten Parametern Laktat und Herzfrequenz mit der Schmerzskala bestätigt diesbezügliche Literaturangaben. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Studie kein messbarer Zusammenhang zwischen Substanz P oder Alpha-Amylase mit dem Kolikgrad festgestellt werden. Die Hypothese, dass Substanz P mit der Schwere der Erkrankung ansteigt, konnte deshalb nicht bestätigt werden. Hingegen konnte beobachtet werden, dass die Pferde unabhängig von der Verabreichung von Medikamenten oder dem Verlauf der Erkrankung einen annähernd konstanten, individuellen Substanz P-Spiegel aufwiesen. Da sowohl gering- als auch hochgradige Kolikpatienten hohe Alpha-Amylase-Werte aufwiesen, konnte die Serum-Alpha-Amylase nicht als hilfreicher Biomarker für Stress durch starke abdominale Schmerzen gewertet werden.

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Studie weder Substanz P noch Alpha-Amylase als verlässliche Stress- und Schmerzparameter bei Kolikpatienten herausgestellt werden. Zukünftige, klar definierte und standardisierte Studien könnten dazu beitragen, die Bedeutung dieser Biomarker besser zu verstehen.

VI. SUMMARY

The famous quote “*The greatness of a nation and its moral progress can be judged by the way its animals are treated*” by Mahatma Gandhi is often used in association with animal welfare. The principle of humane treatment is regarded as the top priority in veterinary medicine. This is reflected by a large number of studies aiming at ensuring optimal patient care and advancing progress in equine medicine. Equine abdominal pain remains one of the most common conditions and diseases as well as potentially life-threatening emergencies in equine practice. Early and objective assessment of a patient’s condition plays a key role for veterinarians. The onset of abdominal pain often correlates with the severity of the disease and its prognosis. The challenge of pain assessment in horses lies in their tendency to display very subtle signs of pain due to their role as flight animals. In addition, the individual perception and expression of pain can vary greatly. Despite the existence of various pain scales for patient assessment, no single, pain-specific biomarker has been detected in horses. Identifying specific biomarkers could significantly contribute to adequate treatment of colic patients and could thereby markedly improve animal welfare.

The aim of this study was to evaluate the biomarkers substance P and alpha amylase in association with cortisol as potential parameters for stress and pain in horses with acute abdominal pain. In thirty patients, four blood samples were taken hourly after admission to an equine clinic due to colic signs. At the same time, the horses were categorized into three colic grades (mild, moderate, and severe) using the Equine Acute Abdominal Pain Scale (Sutton & Bar 2016). In addition, already established parameters such as blood lactate and heart rate were compared to the new parameters.

We hypothesized that substance P increases according to the degree of colic in equines with acute abdominal pain. Preliminary investigation of alpha amylase concentrations in horses with colic showed a wide range, including both low and very high concentrations. Therefore, another hypothesis in the current study was that while low levels might not definitively rule out colic, high levels of alpha amylase might be indicative of stress caused by severe abdominal pain.

The statistically significant correlation between established parameters blood

lactate and heart rate and the Equine Acute Pain Scale confirms the findings of previous studies. In contrast, no measurable correlation between substance P or alpha amylase and the degree of colic was found in the present study. The hypothesis that substance P increases with the severity of the disease could therefore not be confirmed. However, the horses' individual substance P concentrations remained relatively stable within a narrow range throughout the observation period, regardless of the medication administered or the course of disease. Serum alpha amylase did not prove to be a solid biomarker for stress due to severe abdominal pain in horses with acute abdominal pain, as high levels were observed in both mild and severe colic cases.

In summary, the current study could neither evaluate substance P nor alpha amylase as reliable biomarkers for stress and pain in equine colic. In future, clearly defined and standardized studies focusing on substance P and alpha amylase are essential to fully understand their significance as biomarkers in horses.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abraham, M. , Reef, V. B. , Sweeney, R. W. & Navas de Solís, C. (2014). "Gastrointestinal ultrasonography of normal Standardbred neonates and frequency of asymptomatic intussusceptions." *J Vet Intern Med* 28(5): 1580-1586.

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* 46(9): 800-805.

Aleman, M. , Nout-Lomas, Y. S. & Reed, S. M. (2018). Disorders of the Neurologic System. *Equine Internal Medicine*. S. M. Reed, W. M. Bayly and D. C. Sellon, Elsevier. 4th: 648, 652, 664, 674.

Allen, S. K. (2014). "Salivary Alpha-Amylase as an Indicator of Body Stress Following an Acute Session of Repetitive Jumping." *UNLV Theses, Dissertations, Professional Papers, and Capstones*. 2055.

Altman, D. G. , Vergouwe, Y. , Royston, P. & Moons, K. G. (2009). "Prognosis and prognostic research: validating a prognostic model." *Bmj* 338: b605.

Andrews, F. , Bernard, W. , Byars, D. , Cohen, N. D. , Divers, T. J. , MacAllister, C. , McGladdery, A. , Merritt, A. , Murray, M. , Orsini, J. , Snyder, J. R. & Vattistas, N. (1999). "Recommendations for the diagnosis and treatment of equine gastric ulcer syndrome (EGUS): The Equine Gastric Ulcer Council." *Equine Veterinary Education* 11(5): 262-272.

Archer, D. C. (2017). Diseases of the Small Intestine. *The Equine Acute Abdomen*: 704-736.

Archer, D. C. , Freeman, D. E. , Doyle, A. J. , Proudman, C. J. & Edwards, G. B. (2004). "Association between cribbing and entrapment of the small intestine in the epiploic foramen in horses: 68 cases (1991-2002)." *J Am Vet Med Assoc* 224(4): 562-564.

Archer, D. C. , Pinchbeck, G. K. , French, N. P. & Proudman, C. J. (2008). "Risk factors for epiploic foramen entrapment colic: an international study." *Equine Vet J* 40(3): 224-230.

Archer, D. C. & Proudman, C. J. (2006). "Epidemiological clues to preventing colic." *Vet J* 172(1): 29-39.

Arroyo, L. G. , Gomez, D. E. & Martins, C. (2018). "Equine duodenitis-proximal jejunitis: A review." *Can Vet J* 59(5): 510-517.

Ashley, F. H. , Waterman-Pearson, A. E. & Whay, H. R. (2005). "Behavioural assessment of pain in horses and donkeys: application to clinical practice and future studies." *Equine Vet J* 37(6): 565-575.

Ayala, I. , Martos, N. F. , Silvan, G. , Gutierrez-Panizo, C. , Clavel, J. G. & Illera,

J. C. (2012). "Cortisol, adrenocorticotrophic hormone, serotonin, adrenaline and noradrenaline serum concentrations in relation to disease and stress in the horse." *Res Vet Sci* 93(1): 103-107.

Bamberger, C. M. , Schulte, H. M. & Chrousos, G. P. (1996). "Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids." *Endocr Rev* 17(3): 245-261.

Banse, H. E. , Piero, F. D. , Andrews, F. M. , Garcia-Abarca, N. & Watanabe, T. T. N. (2023). "Characterization of gastrointestinal inflammatory cell type in equine glandular gastric disease." *Am J Vet Res* 84(12).

Barnes, P. J. (2014). "Glucocorticoids." *Chem Immunol Allergy* 100: 311-316.

Barragan, A. A. , Bauman, L. M. , Schuenemann, G. M. , Velez, J. , Lakritz, J. , Coetzee, J. F. , Gonzalez, J. D. R. , Piñeiro, J. M. , Menichetti, B. & Bas, S. (2020). "Administration of acetylsalicylic acid after parturition in lactating dairy cows under certified organic management: Part II. Biomarkers of nociception, inflammation, and stress." *J Dairy Sci* 103(12): 11713-11722.

Becker, M. , Hiepe, T. , Samson-Himmelstjerna, G. , Scheidemann, W. , Schusser, G. , Stadtbäumer, G. , Huskamp, B. & Kopf, N. (2016). *Krankheiten des Magen-Darm-Trakts. Handbuch Pferdepraxis.* W. Brehm, H. Gehlen, B. Ohnesorge and A. Wehrend, Enke Verlag.

Belloli, C. , Arioli, F. , Beretta, C. & Madonna, M. (1994). "In vitro effects of tachykinins on the smooth musculature of horse gut." *J Vet Pharmacol Ther* 17(5): 379-383.

Bennett-Wimbush, K. , J, S. B. , Amstutz, M. & Duthie, M. (2020). "Effects of Overcheck Use on Stress Parameters and Welfare Implications in Driving Horses." *J Appl Anim Welf Sci* 23(1): 83-94.

Bishop, A. E. , Hodson, N. P. , Major, J. H. , Probert, L. , Yeats, J. , Edwards, G. B. , Wright, J. A. , Bloom, S. R. & Polak, J. M. (1984). "The regulatory peptide system of the large bowel in equine grass sickness." *Experientia* 40(8): 801-806.

Bishop, R. C. , Gutierrez-Nibeyro, S. D. , Stewart, M. C. & McCoy, A. M. (2022). "Performance of predictive models of survival in horses undergoing emergency exploratory laparotomy for colic." *Vet Surg* 51(6): 891-902.

Bohák, Z. , Szabó, F. , Beckers, J. F. , Melo de Sousa, N. , Kutasi, O. , Nagy, K. & Szenci, O. (2013). "Monitoring the circadian rhythm of serum and salivary cortisol concentrations in the horse." *Domest Anim Endocrinol* 45(1): 38-42.

Bondy, B. , Baghai, T. C. , Minov, C. , Schüle, C. , Schwarz, M. J. , Zwanzger, P. , Rupprecht, R. & Möller, H. J. (2003). "Substance P serum levels are increased in major depression: preliminary results." *Biol Psychiatry* 53(6): 538-542.

Bowden, A. , England, G. C. W. , Brennan, M. L. , Mair, T. S. , Furness, W. A.

, Freeman, S. L. & Burford, J. H. (2020). "Indicators of 'critical' outcomes in 941 horses seen 'out-of-hours' for colic." *Vet Rec* 187(12): 492.

Busoni, V. , De Busscher, V. , Lopez, D. , Verwilghen, D. & Cassart, D. (2011). "Evaluation of a protocol for fast localised abdominal sonography of horses (FLASH) admitted for colic." *Vet J* 188(1): 77-82.

Bussi eres, G. , Jacques, C. , Lainay, O. , Beauchamp, G. , Leblond, A. , Cador e, J. L. , Desmaizi eres, L. M. , Cuvelliez, S. G. & Troncy, E. (2008). "Development of a composite orthopaedic pain scale in horses." *Research in Veterinary Science* 85(2): 294-306.

Bustamante, H. A. , Rodr iguez, A. R. , Herzberg, D. E. & Werner, M. P. (2015). "Stress and pain response after oligofructose induced-lameness in dairy heifers." *J Vet Sci* 16(4): 405-411.

Cavalleri, J.-M. , Bienert-Zeit, A. & Feige, K. (2013). "Untersuchung des akut kolikkranken Pferdes – labordiagnostische und bildgebende Verfahren." *Tier rztliche Praxis Ausgabe G: Gro tiere / Nutztiere* 41: 124-134.

Chang, M. M. & Leeman, S. E. (1970). "Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P." *J Biol Chem* 245(18): 4784-4790.

Chrousos, G. P. (1995). "The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-

mediated inflammation." *N Engl J Med* 332(20): 1351-1362.

Cianci, J. , Boyle, A. G. , Stefanovski, D. & Biddle, A. S. (2021). "Lack of Association Between Barometric Pressure and Incidence of Colic in Equine Academic Ambulatory Practice." *J Equine Vet Sci* 97: 103342.

Clark, J. W. , Senanayake, P. D. , Solomon, G. D. & Gallagher, C. (1994). "Substance P: correlation of CSF and plasma levels." *Headache* 34(5): 261-264.

Coetzee, J. F. , Lubbers, B. V. , Toerber, S. E. , Gehring, R. , Thomson, D. U. , White, B. J. & Apley, M. D. (2008). "Plasma concentrations of substance P and cortisol in beef calves after castration or simulated castration." *Am J Vet Res* 69(6): 751-762.

Cohen, N. D. , Gibbs, P. G. & Woods, A. M. (1999). "Dietary and other management factors associated with colic in horses." *J Am Vet Med Assoc* 215(1): 53-60.

Coizet, B. , Nicoloso, L. , Marletta, D. , Tamiozzo-Calligarich, A. , Pagnacco, G. & Crepaldi, P. (2014). "Variation in salivary and pancreatic alpha-amylase genes in Italian horse breeds." *J Hered* 105(3): 429-435.

Contreras-Aguilar, M. D. , Cerón, J. J. , Muñoz, A. & Ayala, I. (2021). "Changes in saliva biomarkers during a standardized increasing intensity field exercise test in endurance horses." *Animal* 15(6): 100236.

Contreras-Aguilar, M. D. , Escribano, D. , Martín-Cuervo, M. , Tecles, F. & Cerón, J. J. (2018). "Salivary alpha-amylase activity and cortisol in horses with acute abdominal disease: a pilot study." *BMC Vet Res* 14(1): 156.

Contreras-Aguilar, M. D. , Escribano, D. , Martínez-Subiela, S. , Martín-Cuervo, M. , Lamy, E. , Tecles, F. & Cerón, J. J. (2019). "Changes in saliva analytes in equine acute abdominal disease: a sialochemistry approach." *BMC Vet Res* 15(1): 187.

Contreras-Aguilar, M. D. , Henry, S. , Coste, C. , Tecles, F. , Escribano, D. , Cerón, J. J. & Hausberger, M. (2019). "Changes in Saliva Analytes Correlate with Horses' Behavioural Reactions to An Acute Stressor: A Pilot Study." *Animals (Basel)* 9(11).

Contreras-Aguilar, M. D. , Hevia, M. L. , Escribano, D. , Lamy, E. , Tecles, F. & Cerón, J. J. (2020). "Effect of food contamination and collection material in the measurement of biomarkers in saliva of horses." *Res Vet Sci* 129: 90-95.

Contreras-Aguilar, M. D. , Lamy, E. , Escribano, D. , Cerón, J. J. , Tecles, F. , Quiles, A. J. & Hevia, M. L. (2020). "Changes in Salivary Analytes of Horses Due to Circadian Rhythm and Season: A Pilot Study." *Animals (Basel)* 10(9).

Contreras-Aguilar, M. D. , Martínez-Subiela, S. , Cerón, J. J. , Martín-Cuervo, M. , Tecles, F. & Escribano, D. (2019). "Salivary alpha-amylase activity and concentration in horses with acute abdominal disease: Association with outcome."

Equine Vet J 51(5): 569-574.

Cordero, M. , Brorsen, B. W. & McFarlane, D. (2012). "Circadian and circannual rhythms of cortisol, ACTH, and α -melanocyte-stimulating hormone in healthy horses." *Domest Anim Endocrinol* 43(4): 317-324.

Corrigan, F. , Vink, R. & Turner, R. J. (2016). "Inflammation in acute CNS injury: a focus on the role of substance P." *Br J Pharmacol* 173(4): 703-715.

Crumpton, S. M. , Baiker, K. , Hallowell, G. D. , Habershon-Butcher, J. L. & Bowen, I. M. (2015). "Clinical Research Abstracts of the British Equine Veterinary Association Congress 2015." *Equine Vet J* 47 Suppl 48: 9.

Cuesta, M. C. , Quintero, L. , Pons, H. & Suarez-Roca, H. (2002). "Substance P and calcitonin gene-related peptide increase IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha secretion from human peripheral blood mononuclear cells." *Neurochem Int* 40(4): 301-306.

Cummings, J. F. , Sellers, A. F. & Lowe, J. E. (1985). "Distribution of substance P-like immunoreactivity in the enteric neurons of the large colon of normal and amitraz-treated ponies: an immunocytochemical study." *Equine Vet J* 17(1): 23-29.

Curtis, L. , Burford, J. H. , England, G. C. W. & Freeman, S. L. (2019). "Risk factors for acute abdominal pain (colic) in the adult horse: A scoping review of risk factors, and a systematic review of the effect of management-related changes."

PLoS One 14(7): e0219307.

D'Mello, R. & Dickenson, A. H. (2008). "Spinal cord mechanisms of pain." *Br J Anaesth* 101(1): 8-16.

Dai, F. , Leach, M. , MacRae, A. M. , Minero, M. & Costa, E. D. (2020). "Does Thirty-Minute Standardised Training Improve the Inter-Observer Reliability of the Horse Grimace Scale (HGS)? A Case Study." *Animals (Basel)* 10(5).

Dalla Costa, E. , Minero, M. , Lebelt, D. , Stucke, D. , Canali, E. & Leach, M. C. (2014). "Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a pain assessment tool in horses undergoing routine castration." *PLoS One* 9(3): e92281.

Dalla Costa, E. , Stucke, D. , Dai, F. , Minero, M. , Leach, M. C. & Lebelt, D. (2016). "Using the Horse Grimace Scale (HGS) to Assess Pain Associated with Acute Laminitis in Horses (*Equus caballus*)." *Animals (Basel)* 6(8).

Dallap-Schaer, B. & Orsini, J. A. (2014). *Gastrointestinal System. Equine Emergencies: treatment and procedures.* J. A. Orsini and T. J. Divers, Elsevier. 4th.

De Backer, D. (2003). "Lactic acidosis." *Intensive Care Med* 29(5): 699-702.

de Grauw, J. C. & van Loon, J. P. (2016). "Systematic pain assessment in horses." *Vet J* 209: 14-22.

de Grauw, J. C. , van Loon, J. P. , van de Lest, C. H. , Brunott, A. & van Weeren, P. R. (2014). "In vivo effects of phenylbutazone on inflammation and cartilage-derived biomarkers in equine joints with acute synovitis." *Vet J* 201(1): 51-56.

de Sousa-Pereira, P. , Cova, M. , Abrantes, J. , Ferreira, R. , Trindade, F. , Barros, A. , Gomes, P. , Colaço, B. , Amado, F. , Esteves, P. J. & Vitorino, R. (2015). "Cross-species comparison of mammalian saliva using an LC-MALDI based proteomic approach." *Proteomics* 15(9): 1598-1607.

Deegen, E. & Glitz, F. (2010). *Blutkreislaufperipherie. Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferdes*. H. Wissdorf, H. Gerhards, B. Huskamp and E. Deegen, M. & H. Schaper: 871.

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* 21(2): 293-301.

Diakakis, N. & Tyrnenopoulou, P. (2018). "Correlation between equine colic and weather changes." *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 68: 455.

Dieckerhoff, W. (1892). *Lehrbuch der speciellen Pathologie und Therapie für Thierärzte: Die Krankheiten des Pferdes*, August Hirschwald.

Dockweiler, J. C. , Coetzee, J. F. , Edwards-Callaway, L. N. , Bello, N. M. , Glynn, H. D. , Allen, K. A. , Theurer, M. E. , Jones, M. L. , Miller, K. A. & Bergamasco, L. (2013). "Effect of castration method on neurohormonal and electroencephalographic stress indicators in Holstein calves of different ages." *J Dairy Sci* 96(7): 4340-4354.

Domeneghini, C. , Radaelli, G. , Arrighi, S. , Bosi, G. & Dolera, M. (2004). "Cholinergic, nitrenergic and peptidergic (Substance P- and CGRP-utilizing) innervation of the horse intestine. A histochemical and immunohistochemical study." *Histol Histopathol* 19(2): 357-370.

Douglas, F. L. , Palkovits, M. & Brownstein, M. J. (1982). "Regional distribution of substance P-like immunoreactivity in the lower brainstem of the rat." *Brain Res* 245(2): 376-378.

Driessen, B. , Hopster, K. , Ionita, J. & Kästner, S. (2016). *Anästhesiologie. Handbuch Pferdepraxis*. W. Brehm, H. Gehlen, B. Ohnesorge and A. Wehrend, Enke Verlag.

Drudge, J. H. (1979). "Clinical aspects of *Strongylus vulgaris* infection in the horse. Emphasis on diagnosis, chemotherapy, and prophylaxis." *Vet Clin North Am Large Anim Pract* 1(2): 251-265.

Drumm, N. J. , Embertson, R. M. , Woodie, J. B. , Ruggles, A. J. , Hopper, S. A. , Fimmers, R. & Handler, J. (2013). "Factors influencing foaling rate following colic surgery in pregnant Thoroughbred mares in Central Kentucky." *Equine Vet J* 45(3): 346-349.

Dukti, S. & White, N. A. (2009). "Prognosticating equine colic." *Vet Clin North Am Equine Pract* 25(2): 217-231.

Dunkel, B. , Kapff, J. E. , Naylor, R. J. & Boston, R. (2013). "Blood lactate concentrations in ponies and miniature horses with gastrointestinal disease." *Equine Vet J* 45(6): 666-670.

Dybkaer, E. , Steffensen, K. F. , Honore, M. L. , Dinesen, M. A. , Christophersen, M. T. & Pihl, T. H. (2022). "Short-term survival rates of 1397 horses referred for colic from 2010 to 2018." *Acta Vet Scand* 64(1): 11.

Dzikiti, T. B. , Hellebrekers, L. J. & van Dijk, P. (2003). "Effects of intravenous lidocaine on isoflurane concentration, physiological parameters, metabolic parameters and stress-related hormones in horses undergoing surgery." *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 50(4): 190-195.

Ebner, K. , Muigg, P. , Singewald, G. & Singewald, N. (2008). "Substance P in stress and anxiety: NK-1 receptor antagonism interacts with key brain areas of the stress circuitry." *Ann N Y Acad Sci* 1144: 61-73.

Ebner, K. , Rupniak, N. M. , Saria, A. & Singewald, N. (2004). "Substance P in the medial amygdala: emotional stress-sensitive release and modulation of anxiety-related behavior in rats." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(12): 4280-4285.

Ebner, K. & Singewald, N. (2006). "The role of substance P in stress and anxiety responses." *Amino Acids* 31(3): 251-272.

Edwards, G. B. & Proudman, C. J. (1994). "An analysis of 75 cases of intestinal obstruction caused by pedunculated lipomas." *Equine Vet J* 26(1): 18-21.

Egenvall, A. , Penell, J. , Bonnett, B. N. , Blix, J. & Pringle, J. (2008). "Demographics and costs of colic in Swedish horses." *J Vet Intern Med* 22(4): 1029-1037.

Erlanger, J. & Gasser, H. S. (1930). "The Action Potential in fibers of slow conduction in spinal roots and somatic nerves." *American Journal of Physiology-Legacy Content* 92(1): 43-82.

Evangelista, M. C. , Monteiro, B. P. & Steagall, P. V. (2022). "Measurement properties of grimace scales for pain assessment in nonhuman mammals: a systematic review." *Pain* 163(6): e697-e714.

Evans, A. N. , Liu, Y. , Macgregor, R. , Huang, V. & Aguilera, G. (2013). "Regulation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone transcription by elevated glucocorticoids." *Mol Endocrinol* 27(11): 1796-1807.

Everett, J. B. , Schumacher, J. , Doherty, T. J. , Black, R. A. , Amelse, L. L. , Krawczel, P. , Coetzee, J. F. & Whitlock, B. K. (2018). "Effects of stacked wedge pads and chains applied to the forefeet of Tennessee Walking Horses for a five-day

period on behavioral and biochemical indicators of pain, stress, and inflammation." *Am J Vet Res* 79(1): 21-32.

Farrell, A. , Kersh, K. , Liepman, R. & Dembek, K. A. (2021). "Development of a Colic Scoring System to Predict Outcome in Horses." *Front Vet Sci* 8: 697589.

Feickert, M. & Burckhardt, B. B. (2019). "Substance P in cardiovascular diseases - A bioanalytical review." *Clin Chim Acta* 495: 501-506.

Ford, T. S. , Freeman, D. E. , Ross, M. W. , Richardson, D. W. , Martin, B. B. & Madison, J. B. (1990). "Ileocecal intussusception in horses: 26 cases (1981-1988)." *J Am Vet Med Assoc* 196(1): 121-126.

Frederico, L. M. , Jones, S. L. & Blikslager, A. T. (2006). "Predisposing factors for small colon impaction in horses and outcome of medical and surgical treatment: 44 cases (1999-2004)." *J Am Vet Med Assoc* 229(10): 1612-1616.

Freeman, D. E. , Orsini, J. A. , Harrison, I. W. , Muller, N. S. & Leitch, M. (1988). "Complications of umbilical hernias in horses: 13 cases (1972-1986)." *J Am Vet Med Assoc* 192(6): 804-807.

Fu, J. , Liu, C. P. , Zhang, Z. W. , Xing, M. W. & Xu, S. W. (2013). "Influence of inflammatory pathway markers on oxidative stress induced by cold stress in intestine of quails." *Res Vet Sci* 95(2): 495-501.

Fuentes, M. , Tecles, F. , Gutiérrez, A. , Otal, J. , Martínez-Subiela, S. & Cerón, J. J. (2011). "Validation of an automated method for salivary alpha-amylase measurements in pigs (*Sus scrofa domesticus*) and its application as a stress biomarker." *J Vet Diagn Invest* 23(2): 282-287.

Fuentes-Rubio, M. , Fuentes, F. , Otal, J. , Quiles, A. & Hevia, M. L. (2016). "Validation of an assay for quantification of alpha-amylase in saliva of sheep." *Can J Vet Res* 80(3): 197-202.

Fultz, L. E. , Peloso, J. G. , Giguère, S. & Adams, A. R. (2013). "Comparison of phenylephrine administration and exercise versus phenylephrine administration and a rolling procedure for the correction of nephrosplenic entrapment of the large colon in horses: 88 cases (2004-2010)." *J Am Vet Med Assoc* 242(8): 1146-1151.

Furr, M. O. , Lessard, P. & White, N. A., 2nd (1995). "Development of a colic severity score for predicting the outcome of equine colic." *Vet Surg* 24(2): 97-101.

Gaddum, J. H. & Schild, H. (1934). "Depressor substances in extracts of intestine." *J Physiol* 83(1): 1-14.

Galigniana, M. D. , Scruggs, J. L. , Herrington, J. , Welsh, M. J. , Carter-Su, C. , Housley, P. R. & Pratt, W. B. (1998). "Heat shock protein 90-dependent (geldanamycin-inhibited) movement of the glucocorticoid receptor through the cytoplasm to the nucleus requires intact cytoskeleton." *Mol Endocrinol* 12(12): 1903-1913.

Ganjiwale, A. & Cowsik, S. M. (2015). "Membrane-induced structure of novel human tachykinin hemokinin-1 (hHK1)." *Biopolymers* 103(12): 702-710.

Garcia-Seco, E. , Wilson, D. A. , Kramer, J. , Keegan, K. G. , Branson, K. R. , Johnson, P. J. & Tyler, J. W. (2005). "Prevalence and risk factors associated with outcome of surgical removal of pedunculated lipomas in horses: 102 cases (1987-2002)." *J Am Vet Med Assoc* 226(9): 1529-1537.

Gehlen, H. , Faust, M. D. , Grzeskowiak, R. M. & Trachsel, D. S. (2020). "Association Between Disease Severity, Heart Rate Variability (HRV) and Serum Cortisol Concentrations in Horses with Acute Abdominal Pain." *Animals (Basel)* 10(9).

Gitari, A. , Nguhiu, J. , Varma, V. & Mogoia, E. (2017). "Occurrence, treatment protocols, and outcomes of colic in horses within Nairobi County, Kenya." *Vet World* 10(10): 1255-1263.

Gleerup, K. B. , Forkman, B. , Lindegaard, C. & Andersen, P. H. (2015). "An equine pain face." *Vet Anaesth Analg* 42(1): 103-114.

Gonçalves, S. , Julliand, V. & Leblond, A. (2002). "Risk factors associated with colic in horses." *Vet Res* 33(6): 641-652.

Granger, D. A. , Kivlighan, K. T. , el-Sheikh, M. , Gordis, E. B. & Stroud, L. R. (2007). "Salivary alpha-amylase in biobehavioral research: recent developments

and applications." *Ann N Y Acad Sci* 1098: 122-144.

Graubner, C. (2017). Ursachen für Kolik. Differenzialdiagnosen Innere Medizin beim Pferd. H. Gehlen, Enke Verlag: 287.

Graubner, C. , Gerber, V. , Doherr, M. & Spadavecchia, C. (2011). "Clinical application and reliability of a post abdominal surgery pain assessment scale (PASPAS) in horses." *Vet J* 188(2): 178-183.

Grosche, A. , Schrödl, W. & Schusser, G. (2006). "Specific parameters of blood and peritoneal fluid to indicate the severity of intestinal ischemia in colic horses." *Tierärztliche Praxis* 34: 387-396.

Hackett, E. S. , Embertson, R. M. , Hopper, S. A. , Woodie, J. B. & Ruggles, A. J. (2015). "Duration of disease influences survival to discharge of Thoroughbred mares with surgically treated large colon volvulus." *Equine Vet J* 47(6): 650-654.

Harbuz, M. S. & Lightman, S. L. (1992). "Stress and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: acute, chronic and immunological activation." *J Endocrinol* 134(3): 327-339.

Harmar, A. , Schofield, J. G. & Keen, P. (1980). "Cycloheximide-sensitive synthesis of substance P by isolated dorsal root ganglia." *Nature* 284(5753): 267-269.

Harrison, S. & Geppetti, P. (2001). "Substance p." *Int J Biochem Cell Biol* 33(6): 555-576.

Hassel, D. M. , Langer, D. L. , Snyder, J. R. , Drake, C. M. , Goodell, M. L. & Wyle, A. (1999). "Evaluation of enterolithiasis in equids: 900 cases (1973-1996)." *J Am Vet Med Assoc* 214(2): 233-237.

Hector, R. C. & Mama, K. R. (2018). *Recognizing and Treating Pain in Horses. Equine Internal Medicine.* S. M. Reed, W. M. Bayly and D. C. Sellon, Elsevier: 138-155.

Heitzer, M. D. , Wolf, I. M. , Sanchez, E. R. , Witchel, S. F. & DeFranco, D. B. (2007). "Glucocorticoid receptor physiology." *Rev Endocr Metab Disord* 8(4): 321-330.

Hellhammer, D. H. , Wüst, S. & Kudielka, B. M. (2009). "Salivary cortisol as a biomarker in stress research." *Psychoneuroendocrinology* 34(2): 163-171.

Hens, J. , Gajda, M. , Scheuermann, D. W. , Adriaensen, D. & Timmermans, J. P. (2002). "The longitudinal smooth muscle layer of the pig small intestine is innervated by both myenteric and submucous neurons." *Histochem Cell Biol* 117(6): 481-492.

Hernández-Avalos, I. , Mota-Rojas, D. , Mendoza-Flores, J. E. , Casas-Alvarado, A. , Flores-Padilla, K. , Miranda-Cortes, A. E. , Torres-Bernal, F. , Gómez-Prado,

J. & Mora-Medina, P. (2021). "Nociceptive pain and anxiety in equines: Physiological and behavioral alterations." *Vet World* 14(11): 2984-2995.

Hillyer, M. H. , Taylor, F. G. , Proudman, C. J. , Edwards, G. B. , Smith, J. E. & French, N. P. (2002). "Case control study to identify risk factors for simple colonic obstruction and distension colic in horses." *Equine Vet J* 34(5): 455-463.

Hinchcliff, K. W. , Rush, B. R. & Farris, J. W. (2005). "Evaluation of plasma catecholamine and serum cortisol concentrations in horses with colic." *J Am Vet Med Assoc* 227(2): 276-280.

Hoffsis, G. F. & Murdick, P. W. (1970). "The plasma concentrations of corticosteroids in normal and diseased horses." *J Am Vet Med Assoc* 157(11): 1590-1594.

Hofmann, K. (2010). "Die Kolik beim Pferd." *team.konkret* 6(01): 14-17.

Holmgren, S. & Jensen, J. (2001). "Evolution of vertebrate neuropeptides." *Brain Res Bull* 55(6): 723-735.

Honor, P. , Menning, P. M. , Rogers, S. D. , Nichols, M. L. , Basbaum, A. I. , Besson, J. M. & Mantyh, P. W. (1999). "Spinal substance P receptor expression and internalization in acute, short-term, and long-term inflammatory pain states." *J Neurosci* 19(17): 7670-7678.

Hoover, D. B. , Chang, Y. , Hancock, J. C. & Zhang, L. (2000). "Actions of tachykinins within the heart and their relevance to cardiovascular disease." *Jpn J Pharmacol* 84(4): 367-373.

Hudson, J. M. , Cohen, N. D. , Gibbs, P. G. & Thompson, J. A. (2001). "Feeding practices associated with colic in horses." *J Am Vet Med Assoc* 219(10): 1419-1425.

Hunt, S. P. & Mantyh, P. W. (2001). "The molecular dynamics of pain control." *Nat Rev Neurosci* 2(2): 83-91.

Hunter, L. C. , Miller, J. K. & Poxton, I. R. (1999). "The association of *Clostridium botulinum* type C with equine grass sickness: a toxicoinfection?" *Equine Vet J* 31(6): 492-499.

Hwang, H. , Dong, H. J. , Han, J. , Cho, S. , Kim, Y. & Lee, I. (2022). "Prevalence and treatment of gastric ulcers in Thoroughbred racehorses of Korea." *J Vet Sci* 23(2): e19.

Iftikhar, K. , Siddiq, A. , Baig, S. G. & Zehra, S. (2020). "Substance P: A neuropeptide involved in the psychopathology of anxiety disorders." *Neuropeptides* 79: 101993.

Iglesias-García, M. , Rodríguez Hurtado, I. , Ortiz-Díez, G. , De la Calle Del Barrio, J. , Fernández Pérez, C. & Gómez Lucas, R. (2022). "Predictive Models for

Equine Emergency Exploratory Laparotomy in Spain: Pre-, Intra-, and Post-Operative-Mortality-Associated Factors." *Animals (Basel)* 12(11).

Jasim, H. , Carlsson, A. , Hedenberg-Magnusson, B. , Ghafouri, B. & Ernberg, M. (2018). "Saliva as a medium to detect and measure biomarkers related to pain." *Sci Rep* 8(1): 3220.

Karlen, K. J. , Baier, F. S. , Odegard, S. L. , Baumann, R. M. , Coetzee, J. F. , Kehoe, S. I. & Vogel, K. D. (2021). "Efficacy of oral meloxicam as primary pain mitigation following caustic paste disbudding of three day old Holstein calves(1)." *Transl Anim Sci* 5(2): txz151.

Kaya, G. , Sommerfeld-Stur, I. & Iben, C. (2009). "Risk factors of colic in horses in Austria." *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 93(3): 339-349.

Kędzierski, W. , Cywińska, A. , Strzelec, K. & Kowalik, S. (2014). "Changes in salivary and plasma cortisol levels in Purebred Arabian horses during race training session." *Anim Sci J* 85(3): 313-317.

Kędzierski, W. , Strzelec, K. , Cywińska, A. & Kowalik, S. (2013). "Salivary Cortisol Concentration in Exercised Thoroughbred Horses." *Journal of Equine Veterinary Science* 33(12): 1106-1109.

Kienzle, E. , Radicke, S. , Landes, E. , Kleffken, D. , Illenseer, M. & Meyer, H. (1994). "Activity of amylase in the gastrointestinal tract of the horse." *Journal of*

Animal Physiology and Animal Nutrition 72: 234-241.

Kimura, R. , Borankulova, S. & Maratbek, S. Z. (2023). "Effect of difference in training skills on stress in horses trained by Kazakh trainers." *Anim Sci J* 94(1): e13800.

Kleinhenz, M. D. , Gorden, P. J. , Smith, J. S. , Schleining, J. A. , Kleinhenz, K. E. , Juarez, J. R. , Rea, D. & Coetzee, J. F. (2019). "Effects of transdermal flunixin meglumine on experimentally induced lameness in adult dairy cattle." *J Dairy Sci* 102(7): 6418-6430.

Knowles, E. J. , Tremaine, W. H. , Pearson, G. R. & Mair, T. S. (2016). "A database survey of equine tumours in the United Kingdom." *Equine Vet J* 48(3): 280-284.

König, H. E. & Gerhards, H. (2010). Verdauungsorgane und Milz. Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferdes. H. Wissdorf, H. Gerhards, B. Huskamp and E. Deegen, M. & H. Schaper: 681-719.

Kormos, V. & Gaszner, B. (2013). "Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans." *Neuropeptides* 47(6): 401-419.

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* 37(4): 342-346.

Lee, F. Y. , Lin, H. C. , Tsai, Y. T. , Chang, F. Y. , Lu, R. H. , Hou, M. C. , Li, C. P. , Chu, C. J. , Wang, S. S. & Lee, S. D. (1997). "Plasma substance P levels in patients with liver cirrhosis: relationship to systemic and portal hemodynamics." *Am J Gastroenterol* 92(11): 2080-2084.

Lembeck, F. (1953). "[Central transmission of afferent impulses. III. Incidence and significance of the substance P in the dorsal roots of the spinal cord]." *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 219(3): 197-213.

Li, L. , Gao, X. , Zhao, J. , Ji, X. , Wei, H. & Luo, Y. (2009). "Plasma and cerebrospinal fluid substance P in post-stroke patients with depression." *Psychiatry Clin Neurosci* 63(3): 298-304.

Lisowska, B. , Lisowski, A. & Siewruk, K. (2015). "Substance P and Chronic Pain in Patients with Chronic Inflammation of Connective Tissue." *PLoS One* 10(10): e0139206.

Luthersson, N. , Nielsen, K. H. , Harris, P. & Parkin, T. D. (2009). "The prevalence and anatomical distribution of equine gastric ulceration syndrome (EGUS) in 201 horses in Denmark." *Equine Vet J* 41(7): 619-624.

Maggi, C. A. , Patacchini, R. , Giachetti, A. & Meli, A. (1990). "Tachykinin receptors in the circular muscle of the guinea-pig ileum." *Br J Pharmacol* 101(4): 996-1000.

Mair, T. & Sherlock, C. (2023). "Recurrent Colic: Diagnosis, Management, and Expectations." *Vet Clin North Am Equine Pract* 39(2): 399-417.

Mair, T. S. , Sherlock, C. E. & Boden, L. A. (2014). "Serum cortisol concentrations in horses with colic." *Vet J* 201(3): 370-377.

Mair, T. S. & Smith, L. J. (2005). "Survival and complication rates in 300 horses undergoing surgical treatment of colic. Part 2: Short-term complications." *Equine Vet J* 37(4): 303-309.

Malone, E. D. , Kannan, M. S. & Brown, D. R. (2000). "Evaluation of substance P as a neurotransmitter in equine jejunum." *Am J Vet Res* 61(10): 1178-1184.

Marjan, J. & Prišenk, J. (2017). *Assessment of Stress on Horses through the Salivary Cortisol Concentration*. DAAAM International Scientific Book: 055-062.

Marley, L. K. , Soffler, C. & Hackett, E. S. (2018). "Clinical features, diagnostic methods, treatments, and outcomes associated with ingested wires in the abdomen of horses: 16 cases (2002-2013)." *J Am Vet Med Assoc* 253(6): 781-787.

Martineau, H. , Thompson, H. & Taylor, D. (2009). "Pathology of gastritis and gastric ulceration in the horse. Part 1: range of lesions present in 21 mature individuals." *Equine Vet J* 41(7): 638-644.

Mashaghi, A. , Marmalidou, A. , Tehrani, M. , Grace, P. M. , Pothoulakis, C. & Dana, R. (2016). "Neuropeptide substance P and the immune response." *Cell Mol Life Sci* 73(22): 4249-4264.

Maskato, Y. , Dugdale, A. , Singer, E. , Kelmer, G. & Sutton, G. (2020). "Prospective Feasibility and Revalidation of the Equine Acute Abdominal Pain Scale (EAAPS) in Clinical Cases of Colic in Horses." *Animals* 10: 2242.

McConachie, E. L. , Giguère, S. , Rapoport, G. & Barton, M. H. (2016). "Heart rate variability in horses with acute gastrointestinal disease requiring exploratory laparotomy." *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 26(2): 269-280.

McGill, C. A. & Bolton, J. R. (1984). "Gastric retention associated with a pyloric mass in two horses." *Aust Vet J* 61(6): 190-191.

McGorum, B. C. & Pirie, R. S. (2018). "Equine Dysautonomia." *Vet Clin North Am Equine Pract* 34(1): 113-125.

Merritt, A. M. (2009). "Appeal for proper usage of the term 'EGUS': equine gastric ulcer syndrome." *Equine Vet J* 41(7): 616.

Miller, W. L. (2018). "The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: A Brief History." *Horm Res Paediatr* 89(4): 212-223.

Mistrova, E. , Kruzliak, P. & Chottova Dvorakova, M. (2016). "Role of substance P in the cardiovascular system." *Neuropeptides* 58: 41-51.

Mohr, E. , Witte, E. & Voss, B. (2000). "Heart rate variability as stress indicator Summary." *Archives of Animal Breeding* 43.

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

Moore, R. M. , Charalambous, A. C. & Masty, J. (1996). "Alterations in colonic arterial and venous plasma neuropeptide concentrations in horses during low-flow ischemia and reperfusion of the large colon." *Am J Vet Res* 57(8): 1200-1205.

Moro, M. H. , Beran, G. W. , Hoffman, L. J. & Griffith, R. W. (1998). "Effects of cold stress on the antimicrobial drug resistance of *Escherichia coli* of the intestinal flora of swine." *Lett Appl Microbiol* 27(5): 251-254.

Mosher, R. A. , Coetzee, J. F. , Allen, P. S. , Havel, J. A. , Griffith, G. R. & Wang, C. (2014). "Effects of sample handling methods on substance P concentrations and immunoreactivity in bovine blood samples." *Am J Vet Res* 75(2): 109-116.

Muñoz, E. , Argüelles, D. , Areste, L. , Miguel, L. S. & Prades, M. (2008). "Retrospective analysis of exploratory laparotomies in 192 Andalusian horses and 276 horses of other breeds." *Vet Rec* 162(10): 303-306.

Newton, R. (2000). "Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important?" *Thorax* 55(7): 603-613.

Nielsen, M. K. , Jacobsen, S. , Olsen, S. N. , Bousquet, E. & Pihl, T. (2016). "Nonstrangulating intestinal infarction associated with *Strongylus vulgaris* in referred Danish equine cases." *Equine Vet J* 48(3): 376-379.

Nikvand, A. A. , Jalali, S. M. , Ghadrhan Mashhadi, A. , Razi Jalali, M. & Hassanpour Amirabadi, S. (2019). "Clinical, hematologic, hemostatic, and serum biochemical findings related to survival in Arabian horses with colic." *Vet Clin Pathol* 48(3): 441-448.

Oliver, S. R. , Phillips, N. A. , Novosad, V. L. , Bakos, M. P. , Talbert, E. E. & Clanton, T. L. (2012). "Hyperthermia induces injury to the intestinal mucosa in the mouse: evidence for an oxidative stress mechanism." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302(7): R845-853.

Olson, M. E. , Ralston, B. , Burwash, L. , Matheson-Bird, H. & Allan, N. D. (2016). "Efficacy of oral meloxicam suspension for prevention of pain and inflammation following band and surgical castration in calves." *BMC Vet Res* 12(1): 102.

Onuoha, G. N. & Alpar, E. K. (1999). "Calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides in the plasma of patients with soft tissue injury." *Life Sci* 65(13): 1351-1358.

Otsuka, M. , Konishi, S. , Takahashi, T. & Saito, K. (1976). "Substance P and primary afferent transmission." *Adv Biochem Psychopharmacol* 15: 187-191.

Palazzolo, D. L. & Quadri, S. K. (1987). "The effects of aging on the circadian rhythm of serum cortisol in the dog." *Exp Gerontol* 22(6): 379-387.

Park, S. W. , Yan, Y. P. , Satriotomo, I. , Vemuganti, R. & Dempsey, R. J. (2007). "Substance P is a promoter of adult neural progenitor cell proliferation under normal and ischemic conditions." *J Neurosurg* 107(3): 593-599.

Parry, B. W. & Crisman, M. V. (1991). "Serum and peritoneal fluid amylase and lipase reference values in horses." *Equine Vet J* 23(5): 390-391.

Patak, E. N. , Pennefather, J. N. & Story, M. E. (2000). "Effects of tachykinins on uterine smooth muscle." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27(11): 922-927.

Pennefather, J. N. , Lecci, A. , Candenas, M. L. , Patak, E. , Pinto, F. M. & Maggi, C. A. (2004). "Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family." *Life Sci* 74(12): 1445-1463.

Perry, G. H. , Dominy, N. J. , Claw, K. G. , Lee, A. S. , Fiegler, H. , Redon, R. , Werner, J. , Villanea, F. A. , Mountain, J. L. , Misra, R. , Carter, N. P. , Lee, C. & Stone, A. C. (2007). "Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation." *Nat Genet* 39(10): 1256-1260.

Pihl, T. H. , Nielsen, M. K. , Olsen, S. N. , Leifsson, P. S. & Jacobsen, S. (2018). "Nonstrangulating intestinal infarctions associated with *Strongylus vulgaris*: Clinical presentation and treatment outcomes of 30 horses (2008-2016)." *Equine Vet J* 50(4): 474-480.

Pirie, R. S. , Jago, R. C. & Hudson, N. P. (2014). "Equine grass sickness." *Equine Vet J* 46(5): 545-553.

Pirie, R. S. & McGorum, B. C. (2016). "Equine grass sickness: Benefits of a multifaceted research approach." *Equine Vet J* 48(6): 770-772.

Plummer, A. E. (2009). "Impactions of the small and large intestines." *Vet Clin North Am Equine Pract* 25(2): 317-327.

Plummer, A. E. , Rakestraw, P. C. , Hardy, J. & Lee, R. M. (2007). "Outcome of medical and surgical treatment of cecal impaction in horses: 114 cases (1994-2004)." *J Am Vet Med Assoc* 231(9): 1378-1385.

Pritchett, L. , Ulibarri, C. , Roberts, M. , Schneider, R. & Sellon, D. (2003). "Identification of potential physiological and behavioral indicators of postoperative pain in horses after exploratory celiotomy for colic." *Applied Animal Behaviour Science - APPL ANIM BEHAV SCI* 80: 31-43.

Proudman, C. J. , Dugdale, A. H. , Senior, J. M. , Edwards, G. B. , Smith, J. E. , Leuwer, M. L. & French, N. P. (2006). "Pre-operative and anaesthesia-related risk

factors for mortality in equine colic cases." *Vet J* 171(1): 89-97.

Purnama, M. T. E. , Hendrawan, D. , Wicaksono, A. P. , Fikri, F. , Purnomo, A. & Chhetri, S. (2021). "Risk factors, hematological and biochemical profile associated with colic in Delman horses in Gresik, Indonesia." *F1000Res* 10: 950.

Raekallio, M. , Taylor, P. M. & Bennett, R. C. (1997). "Preliminary investigations of pain and analgesia assessment in horses administered phenylbutazone or placebo after arthroscopic surgery." *Vet Surg* 26(2): 150-155.

Ragle, C. A. , Meagher, D. M. , Lacroix, C. A. & Honnas, C. M. (1989). "Surgical treatment of sand colic. Results in 40 horses." *Vet Surg* 18(1): 48-51.

Raja, S. N. , Carr, D. B. , Cohen, M. , Finnerup, N. B. , Flor, H. , Gibson, S. , Keefe, F. J. , Mogil, J. S. , Ringkamp, M. , Sluka, K. A. , Song, X. J. , Stevens, B. , Sullivan, M. D. , Tutelman, P. R. , Ushida, T. & Vader, K. (2020). "The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises." *Pain* 161(9): 1976-1982.

Redkiewicz, P. (2022). "The Regenerative Potential of Substance P." *Int J Mol Sci* 23(2).

Reeves, M. J. (1997). "What really causes colic in horses? Epidemiology's role in elucidating the ultimate multi-factorial disease." *Equine Vet J* 29(6): 413-414.

Reeves, M. J. , Salman, M. D. & Smith, G. (1996). "Risk factors for equine acute abdominal disease (colic): Results from a multi-center case-control study." *Preventive Veterinary Medicine* 26(3): 285-301.

Reynolds, W. J. , Chiu, B. & Inman, R. D. (1988). "Plasma substance P levels in fibrositis." *J Rheumatol* 15(12): 1802-1803.

Ribeiro-da-Silva, A. & Hökfelt, T. (2000). "Neuroanatomical localisation of Substance P in the CNS and sensory neurons." *Neuropeptides* 34(5): 256-271.

Rietmann, T. R. , Stauffacher, M. , Bernasconi, P. , Auer, J. A. & Weishaupt, M. A. (2004). "The association between heart rate, heart rate variability, endocrine and behavioural pain measures in horses suffering from laminitis." *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 51(5): 218-225.

Rodriguez, A. R. , Herzberg, D. E. , Werner, M. P. , Müller, H. Y. & Bustamante, H. A. (2018). "Plasma Concentration of Norepinephrine, β -endorphin, and Substance P in Lame Dairy Cows." *J Vet Res* 62(2): 193-197.

Saidi, M. , Kamali, S. & Beaudry, F. (2016). "Characterization of Substance P processing in mouse spinal cord S9 fractions using high-resolution Quadrupole-Orbitrap mass spectrometry." *Neuropeptides* 59: 47-55.

Sakanaka, M. , Inagaki, S. , Shiosaka, S. , Senba, E. , Takagi, H. , Takatsuki, K. , Kawai, Y. , Iida, H. , Hara, Y. & Tohyama, M. (1982). "Ontogeny of substance

P-containing neuron system of the rat: immunohistochemical analysis--II. Lower brain stem." *Neuroscience* 7(5): 1097-1126.

Sanchez, L. C. (2018). Disorders of the Gastrointestinal System. *Equine Internal Medicine*. S. M. Reed, W. M. Bayly and D. C. Sellon, Elsevier: 773-810.

Sandin, A. , Skidell, J. , Häggström, J. & Nilsson, G. (2000). "Postmortem findings of gastric ulcers in Swedish horses older than age one year: a retrospective study of 3715 horses (1924-1996)." *Equine Vet J* 32(1): 36-42.

Sann, H. (2022). Nozizeption und Schmerz. *Physiologie der Haustiere*. G. Breves, M. Diener and G. Gäbel, Georg Thieme Verlag KG.

Santschi, E. M. , LeBlanc, M. M. & Weston, P. G. (1991). "Progestagen, oestrone sulphate and cortisol concentrations in pregnant mares during medical and surgical disease." *J Reprod Fertil Suppl* 44: 627-634.

Scantlebury, C. E. , Archer, D. C. , Proudman, C. J. & Pinchbeck, G. L. (2015). "Management and horse-level risk factors for recurrent colic in the UK general equine practice population." *Equine Vet J* 47(2): 202-206.

Scharner, D. (2011). Abdomen. *Atlas der Ultraschalluntersuchung beim Pferd*. P.S. Glatzel, Schlütersche.

Scholler, D. (2023). "Evaluierung von Alpha-Amylase und Substanz P als neue Stressparameter bei gerittenen Pferden mit eng verschnallten Nasenriemen in einem vierstufigen Stressmodell." Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München: Tierärztliche Fakultät.

Scholler, D. , Zablotzki, Y. & May, A. (2023). "Evaluation of Substance P as a New Stress Parameter in Horses in a Stress Model Involving Four Different Stress Levels." *Animals (Basel)* 13(7).

Schröder, B. & Rummel, C. (2022). *Spezielle Endokrinologie. Physiologie der Haustiere.* G. Breves, M. Diener and G. Gäbel, Georg Thieme Verlag KG: 571-572.

Sellon, D. C. , Sanz, M. , Kopper, J. J. & Mattei, D. (2022). "Pain severity scores for common equine disorders as provided by horse owners and equine veterinarians." *Equine Veterinary Journal* 54(6): 1094-1102.

Selye, H. (1998). "A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936." *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 10(2): 230-231.

Shaw, S. D. & Stämpfli, H. (2018). "Diagnosis and Treatment of Undifferentiated and Infectious Acute Diarrhea in the Adult Horse." *Vet Clin North Am Equine Pract* 34(1): 39-53.

Sickinger, M. (2007). "Neuropeptidgehalt der bovinen Labmagenwand in Abhängigkeit von Rasse und Verlagerungszustand." Dissertation, Justus-Liebig-

Universität Gießen: Klinik für Wiederkäuer und Schweine (Innere Medizin und Chirurgie); Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie.

Sickinger, M. , Roth, J. , Failing, K. & Wehrend, A. (2018). "Serum neuropeptide concentrations in cows with intrapartum uterine torsion." *Anim Reprod Sci* 196: 193-196.

Siwińska, N. , Żak-Bochenek, A. , Paszkowska, M. , Karczewski, M. , Długopolska, D. & Haider, W. (2022). "Retrospective Evaluation of the Most Frequently Observed Histological Changes in Duodenal and Rectal Mucosal Biopsies in Horses with Recurrent Colic." *Animals (Basel)* 12(24).

Skoluda, N. , La Marca, R. , Gollwitzer, M. , Müller, A. , Limm, H. , Marten-Mittag, B. , Gündel, H. , Angerer, P. & Nater, U. M. (2017). "Long-term stability of diurnal salivary cortisol and alpha-amylase secretion patterns." *Physiology & Behavior* 175: 1-8.

Smanik, L. E. , Moser, D. K. , Rothers, K. P. & Hackett, E. S. (2022). "Serial venous lactate measurement following gastrointestinal surgery in horses." *J Vet Sci* 23(5): e66.

Snyder, J. R. , Pascoe, J. R. , Olander, H. J. , Spier, S. J. , Meagher, D. M. & Bleifer, D. R. (1989). "Strangulating volvulus of the ascending colon in horses." *J Am Vet Med Assoc* 195(6): 757-764.

Southwood, L. L. , Gassert, T. & Lindborg, S. (2010). "Colic in geriatric compared to mature nongeriatric horses. Part 1: Retrospective review of clinical and laboratory data." *Equine Vet J* 42(7): 621-627.

Souza, D. G. , Mendonça, V. A. , de, A. C. M. S. , Poole, S. & Teixeira, M. M. (2002). "Role of tachykinin NK receptors on the local and remote injuries following ischaemia and reperfusion of the superior mesenteric artery in the rat." *Br J Pharmacol* 135(2): 303-312.

Spadari, A. , Gialletti, R. , Gandini, M. , Valle, E. , Cerullo, A. , Cavallini, D. , Bertoletti, A. , Rinnovati, R. , Forni, G. , Scilimati, N. & Giusto, G. (2023). "Short-Term Survival and Postoperative Complications Rates in Horses Undergoing Colic Surgery: A Multicentre Study." *Animals (Basel)* 13(6).

Speirs, V. C. , van Veenendaal, J. C. , Christie, B. A. , Lavelle, R. B. & Gay, C. C. (1981). "Obstruction of the small colon by intramural haematoma in three horses." *Aust Vet J* 57(2): 88-90.

Steiner, J. M. , Newman, S. , Xenoulis, P. , Woosley, K. , Suchodolski, J. , Williams, D. & Barton, L. (2008). "Sensitivity of serum markers for pancreatitis in dogs with macroscopic evidence of pancreatitis." *Vet Ther* 9(4): 263-273.

Steinhoff, M. S. , von Mentzer, B. , Geppetti, P. , Pothoulakis, C. & Bunnett, N. W. (2014). "Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease." *Physiol Rev* 94(1): 265-301.

Stephen, J. O. , Corley, K. T. , Johnston, J. K. & Pfeiffer, D. (2004). "Small intestinal volvulus in 115 horses: 1988-2000." *Vet Surg* 33(4): 333-339.

Stewart, H. L. , Engiles, J. B. , Stefanovski, D. & Southwood, L. (2018). "Clinical and intestinal histologic features of horses treated for recurrent colic: 66 cases (2006-2015)." *J Am Vet Med Assoc* 252(10): 1279-1288.

Stokol, T. (2014). *Cytology. Equine Emergencies*. J. Orsini and T. J. Divers, Elsevier: 47.

Strombeck, D. R. , Farver, T. & Kaneko, J. J. (1981). "Serum amylase and lipase activities in the diagnosis of pancreatitis in dogs." *Am J Vet Res* 42(11): 1966-1970.

Strzelec, K. , Kankofer, M. & Pietrzak, S. (2011). "Cortisol concentration in the saliva of horses subjected to different kinds of exercise." *Acta Veterinaria Brno* 80: 101-105.

Sutton, G. A. , Atamna, R. , Steinman, A. & Mair, T. S. (2019). "Comparison of three acute colic pain scales: Reliability, validity and usability." *Vet J* 246: 71-77.

Sutton, G. A. & Bar, L. (2016). "Refinement and Revalidation of the Equine Acute Abdominal Pain Scale (EAAPS)." *Israel Journal of Veterinary Medicine* 71(1): 15-23.

Sutton, G. A. , Dahan, R. , Turner, D. & Paltiel, O. (2013). "A behaviour-based pain scale for horses with acute colic: scale construction." *Vet J* 196(3): 394-401.

Sutton, G. A. , Ertzman-Ginsburg, R. , Steinman, A. & Milgram, J. (2009). "Initial investigation of mortality rates and prognostic indicators in horses with colic in Israel: a retrospective study." *Equine Vet J* 41(5): 482-486.

Sutton, G. A. , Paltiel, O. , Soffer, M. & Turner, D. (2013). "Validation of two behaviour-based pain scales for horses with acute colic." *Vet J* 197(3): 646-650.

Suvas, S. (2017). "Role of Substance P Neuropeptide in Inflammation, Wound Healing, and Tissue Homeostasis." *J Immunol* 199(5): 1543-1552.

Sykes, B. W. , Hewetson, M. , Hepburn, R. J. , Luthersson, N. & Tamzali, Y. (2015). "European College of Equine Internal Medicine Consensus Statement--Equine Gastric Ulcer Syndrome in Adult Horses." *J Vet Intern Med* 29(5): 1288-1299.

Tamzali, Y. , Marguet, C. , Priymenko, N. & Lyazrhi, F. (2011). "Prevalence of gastric ulcer syndrome in high-level endurance horses." *Equine Veterinary Journal* 43(2): 141-144.

Taylor, P. M. , Pascoe, P. J. & Mama, K. R. (2002). "Diagnosing and treating pain in the horse. Where are we today?" *Vet Clin North Am Equine Pract* 18(1): 1-19, v.

Tecles, F. , Fuentes-Rubio, M. , Tvarijonaviciute, A. , Martínez-Subiela, S. , Fatjó, J. & Cerón, J. J. (2014). "Assessment of stress associated with an oral public speech in veterinary students by salivary biomarkers." *J Vet Med Educ* 41(1): 37-43.

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

Tinker, M. K. , White, N. A. , Lessard, P. , Thatcher, C. D. , Pelzer, K. D. , Davis, B. & Carmel, D. K. (1997). "Prospective study of equine colic incidence and mortality." *Equine Vet J* 29(6): 448-453.

Touitou, Y. & Haus, E. (2000). "Alterations with aging of the endocrine and neuroendocrine circadian system in humans." *Chronobiol Int* 17(3): 369-390.

Traub-Dargatz, J. L. , Koprak, C. A. , Seitzinger, A. H. , 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 Assoc* 219(1): 67-71.

Tschoner, T. (2021). "Methods for Pain Assessment in Calves and Their Use for the Evaluation of Pain during Different Procedures-A Review." *Animals (Basel)* 11(5).

Tschoner, T. & Feist, M. (2022). "Substance P concentrations in the blood plasma and serum of adult cattle and calves during different painful procedures and conditions - a systematic review." *BMC Vet Res* 18(1): 232.

v. Euler, U. S. & Gaddum, J. H. (1931). "An unidentified depressor substance in certain tissue extracts." *J Physiol* 72(1): 74-87.

Valberg, S. J. (2018). Disorders of the Musculoskeletal System. *Equine Internal Medicine*. S. M. Reed, W. M. B. Bayly and D. C. Sellon Elsevier: 555, 566, 571.

van Dierendonck, M. C. & van Loon, J. P. (2016). "Monitoring acute equine visceral pain with the Equine Utrecht University Scale for Composite Pain Assessment (EQUUS-COMPASS) and the Equine Utrecht University Scale for Facial Assessment of Pain (EQUUS-FAP): A validation study." *Vet J* 216: 175-177.

van Loon, J. P. , Jonckheer-Sheehy, V. S. , Back, W. , van Weeren, P. R. & Hellebrekers, L. J. (2014). "Monitoring equine visceral pain with a composite pain scale score and correlation with survival after emergency gastrointestinal surgery." *Vet J* 200(1): 109-115.

van Loon, J. P. & van Dierendonck, M. C. (2015). "Monitoring acute equine visceral pain with the Equine Utrecht University Scale for Composite Pain Assessment (EQUUS-COMPASS) and the Equine Utrecht University Scale for Facial Assessment of Pain (EQUUS-FAP): A scale-construction study." *Vet J* 206(3): 356-364.

van Loon, J. P. & van Dierendonck, M. C. (2017). "Monitoring equine head-related pain with the Equine Utrecht University scale for facial assessment of pain (EQUUS-FAP)." *Vet J* 220: 88-90.

van Loon, J. P. & van Dierendonck, M. C. (2018). "Objective pain assessment in horses (2014-2018)." *Vet J* 242: 1-7.

Videla, R. & Andrews, F. M. (2009). "New perspectives in equine gastric ulcer syndrome." *Vet Clin North Am Equine Pract* 25(2): 283-301.

Vokes, J. , Lovett, A. & Sykes, B. (2023). "Equine Gastric Ulcer Syndrome: An Update on Current Knowledge." *Animals (Basel)* 13(7).

Wagner, A. E. (2010). "Effects of stress on pain in horses and incorporating pain scales for equine practice." *Vet Clin North Am Equine Pract* 26(3): 481-492.

Wallace, J. L. , McKnight, W. , Reuter, B. K. & Vergnolle, N. (2000). "NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2." *Gastroenterology* 119(3): 706-714.

Walsh, D. A. & D, F. M. (2006). "Tachykinins and the cardiovascular system." *Curr Drug Targets* 7(8): 1031-1042.

Wang, L. , Zhou, S. , Li, R. , Zheng, L. , Zhu, J. , Hu, S. & Sun, Y. (2012).

"Serum Levels of Calcitonin Gene-Related Peptide and Substance P are Decreased in Patients with Diabetes Mellitus and Coronary Artery Disease." *Journal of International Medical Research* 40(1): 134-140.

Ward, E. , Slocumb, C. H. , Polley, H. F. , Kendall, E. C. & Hench, P. S. (1951). "Clinical effects of cortisone administered orally to 100 patients with rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* 10(4): 477-484.

Warner, R. , Kleinhenz, M. D. , Ydstie, J. A. , Schleining, J. A. , Wulf, L. W. , Coetzee, J. F. & Gorden, P. J. (2021). "Randomized controlled trial comparison of analgesic drugs for control of pain associated with induced lameness in lactating dairy cattle." *J Dairy Sci* 104(2): 2040-2055.

White, N. (2009). "Colic prevalence, risk factors and prevention." *Advances in Equine Nutrition Vol IV*: 313-326.

White, N. A., 2nd & Dabareiner, R. M. (1997). "Treatment of impaction colics." *Vet Clin North Am Equine Pract* 13(2): 243-259.

Whitfield-Cargile, C. M. , Coleman, M. C. , Cohen, N. D. , Chamoun-Emanuelli, A. M. , DeSolis, C. N. , Tetrault, T. , Sowinski, R. , Bradbery, A. & Much, M. (2021). "Effects of phenylbutazone alone or in combination with a nutritional therapeutic on gastric ulcers, intestinal permeability, and fecal microbiota in horses." *J Vet Intern Med* 35(2): 1121-1130.

Williams, R. J. , Marlin, D. J. , Smith, N. , Harris, R. C. , Haresign, W. & Davies Morel, M. C. (2002). "Effects of cool and hot humid environmental conditions on neuroendocrine responses of horses to treadmill exercise." *Vet J* 164(1): 54-63.

Williams, S. , Horner, J. , Orton, E. , Green, M. , McMullen, S. , Mobasheri, A. & Freeman, S. L. (2015). "Water intake, faecal output and intestinal motility in horses moved from pasture to a stabled management regime with controlled exercise." *Equine Vet J* 47(1): 96-100.

Winfield, L. S. & Dechant, J. E. (2015). "Primary gastric rupture in 47 horses (1995-2011)." *Can Vet J* 56(9): 953-958.

Wolffram, S. (2022). Funktionen des Dünndarms und seiner Anhangsdrüsen. *Physiologie der Haustiere*. G. Breves, M. Diener and G. Gäbel, Georg Thieme Verlag KG.

Wong, C. M. , Boyle, E. M. , Stephen, R. I. , Smith, J. , Stenson, B. J. , McIntosh, N. & Laing, I. A. (2010). "Normative values of substance P and neurokinin A in neonates." *Ann Clin Biochem* 47(Pt 4): 331-335.

Wormstrand, B. H. , Ihler, C. F. , Diesen, R. & Krontveit, R. I. (2014). "Surgical treatment of equine colic - a retrospective study of 297 surgeries in Norway 2005-2011." *Acta Vet Scand* 56(1): 38.

Xu, G. Y. , Huang, L. Y. & Zhao, Z. Q. (2000). "Activation of silent

mechanoreceptive cat C and Adelta sensory neurons and their substance P expression following peripheral inflammation." *J Physiol* 528 Pt 2(Pt 2): 339-348.

Yamout, S. Z. , Nieto, J. E. , Anderson, J. , De Cock, H. E. , Vapniarsky, N. & Aleman, M. (2012). "Pathological evidence of pancreatitis in 43 horses (1986-2011)." *Equine Vet J Suppl*(43): 45-50.

Zalecki, M. (2019). "Gastric ulcer induced changes in substance P and Nk1, Nk2, Nk3 receptors expression in different stomach localizations with regard to intrinsic neuronal system." *Histochem Cell Biol* 151(1): 29-42.

Zeitler-Feicht, M. H. (2019). *Umgang mit Pferden. Der Huf.* L. Litzke, Georg Thieme Verlag.

VIII. DANKSAGUNG

Der größte Dank geht an meine Doktormutter Prof. Dr. Anna May. Ohne sie wäre die Arbeit nie möglich gewesen. Danke Anna- für deine Zeit, die besonders schnellen und fachlich wertvollen Korrekturen, und ganz besonders für deine aufbauenden Worte.

Vielen Dank auch an Dr. Stefan Gesell-May, der zwar im Hintergrund aber doch viel zur Doktorarbeit beigetragen und mich auch jederzeit unterstützt hat. Es war zu Beginn seine Idee, gemeinsam mit ihm und Anna eine Arbeit zu verfassen.

Vielen Dank auch an Yuri Zablotki für die Statistik der Studie.

Meinen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen der Pferdeklinik in Parsdorf möchte ich auch danken, viele haben mich bei der Probenentnahme unterstützt. Besonderer Dank auch an Dr. Karl Schweighofer, für die Möglichkeit in der Klinik Proben sammeln zu dürfen.

Danke an die Pferdeklinik am Airport, für die nette und unkomplizierte Zusammenarbeit.

Großer Dank gilt natürlich auch meinen jetzigen Kolleginnen und Kollegen aus der Pferdeklinik der LMU. Danke besonders an Dominik für die gute Zusammenarbeit bei unseren Studien, aber auch an alle anderen fürs Zuhören und Unterstützen.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mir immer die Möglichkeit gegeben haben mich weiter zu entwickeln, egal in welche Richtung. Danke für eure bedingungslose Unterstützung, ohne euch wäre ich nie so weit gekommen.

Mein Fels in der Brandung war über die letzten 2 Jahre während der Doktorarbeit mein Freund Dani. Du hast mich ertragen, mich aufgebaut und mir Kraft zugesprochen. Mich umsorgt, nachts statistische Fragen beantwortet und zu guter Letzt Korrektur gelesen. Danke, Dani!