

1. Einleitung

Eine der wichtigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität von adulten Pferden und Fohlen ist die Endotoxämie (Moore u. Barton 2003, 681-695; Werners et al. 2005, 371-383). Bakterielle Endotoxine spielen dabei in zahlreichen pathophysiologischen Prozessen und Erkrankungszuständen eine zentrale Rolle. Dies beeinflusst sowohl die Makrozirkulation als auch die Mikrozirkulation. Mit einem Gefäßdurchmesser von unter 100 Mikrometer, ist die Mikrozirkulation als Hauptort des Sauerstoff- und Nährstoffaustausches zwischen Blut und Gewebe anzusehen (Ince et al. 2018, 281-299). Endotoxisch septische Prozesse führen zu einer dysregulierten Immunantwort und einer eingeschränkten Gewebedurchblutung mit vermindertem Sauerstoffaustausch und Organhypoxie. Dies bedingt eine Mikrozirkulationsstörung mit konsekutiver Beeinträchtigung der Makrohämodynamik und Organdysfunktion (Elbers u. Ince 2006, 221; De Backer et al. 2014, 73-79). Bei kritisch kranken und septischen Patienten besteht eine hohe Mortalitätsrate, wenn therapeutische Maßnahmen nur anhand globaler hämodynamischer Indices ausgerichtet sind (Bezemer et al. 2012, 224). Eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase spielt dabei die endotheliale Glykokalix (Uchimido et al. 2019, 16). Die kohlenhydratreiche Schicht der endothelialen Glykokalix kleidet das Endothel luminal aus (Reitsma et al. 2007, 345-359). Die Aufrechterhaltung der Gefäßpermeabilität (Reitsma et al. 2007, 345-359) sowie die vaskuläre Mechanotransduktion (Gaudette et al. 2020, 117-134) zählen zu einigen der zahlreichen Funktionen der endothelialen Glykokalix. Der Verlust oder die Degradation der endothelialen Glykokalix beeinflusst die Inflamationsprozesse, die Koagulation und die vaskuläre Permeabilität (Gaudette et al. 2020, 117-134). Mittels quantitativer ELISAs können spezifische Bestandteile sogenannter Sheddingprodukte der derangierten endothelialen Glykokalix im Blut gemessen werden. Dabei korreliert der Schweregrad der Erkrankung mit der Höhe der Sheddingproduktkonzentration (Nelson et al. 2008, 623-627; Saoraya et al. 2021, 83-89). Klassische kardiovaskuläre Parameter wie die Herzfrequenz, der Blutdruck und die kapilläre Rückfüllungszeit werden als Indikatoren herangezogen, um die Perfusion

und den kardiovaskulären Status zu beurteilen. Diese besitzen jedoch eine geringe Spezifität in Hinblick auf die Gewebepерfusion und können diese nur bedingt abbilden (De Backer et al. 2002, 98-104; Edul et al. 2014, 39). Veränderungen im Bereich der Mikrozirkulation können durch septische Prozesse ausgelöst werden (De Backer et al. 2002, 98-104). Wird die globale Hämodynamik mit der Hämodynamik der Mikrozirkulation bei elektiven Operationen beim Pferd verglichen, kann mithilfe der Seitenstrom-Dunkelfeldmikroskopie festgestellt werden, dass sich die Makrozirkulation und die Mikrozirkulation in kritisch erkrankten Pferden unabhängig voneinander verhalten (Mansour et al. 2021, 574-581). Ebenfalls konnten Veränderungen im Bereich der intestinalen Mikrozirkulation bei kolikchirurgischen Eingriffen festgestellt werden, welche nicht in Verbindung mit Makroperfusionsparametern zu stehen scheinen (Hurcombe et al. 2014, 674-680).

In der vorliegenden Studie soll dargestellt werden, wie eine definierte, induzierte, frühe Endotoxämie die Makro- und Mikrozirkulation inklusive der Glykokalixschädigung des Pferdes beeinflusst.

Folgende Hypothesen sollen untersucht werden:

1. Die direkte Visualisierung der peripheren Mikrozirkulation mithilfe der SDF-Kamera und die quantitative Bestimmung der Mikrozirkulation mithilfe von einer Kombination von Weißlichtspektrometrie und Laser-Doppler-Spektroskopie ist am Pferd an verschiedenen gut zugänglichen Lokalisationen möglich und lässt frühe Abweichungen erkennen.
2. Der Nachweis und der Anstieg von Glykokalix-Sheddingprodukte in der Blutbahn zeigt eine Schädigung des Gefäßendothels bereits in der Frühphase einer Endotoxämie an.

2. Literaturübersicht

2.1 Endotheliale Glykokalix

2.1.1 Aufbau

Das Wort Glykokalix leitet sich vom griechischen Wort „*glykos*“ für Zucker und „*kalyx*“ für Mantel ab. Im Jahr 1963 wurde dieser Neologismus für den neu entdeckten, polysaccharidreichen Mantel auf der Außenseite der Plasmamembranen von eukaryotischen Zelle, unter anderem Muskelzellen, Epithelzellen und Endothelzellen definiert (Bennet 1963, 14-23). Im lebenden Organismus wurde in den 1980er-Jahren beobachtet, dass Bestandteile des Blutes mit der anatomisch definierten Gefäßwand nicht in direkten Kontakt treten. Physikalisch wurde das als „Fåhræus-Lindquist-Effekt“ beschrieben (Ascolese et al. 2019, 379-394). Diese Erklärung wurde aber durch die Gabe von Hyaluronidase und Heparinase widerlegt (Chappell et al. 2008, 79-82). Die primäre Grenze zwischen dem Endothel und dem zirkulierenden Blut bildet die endotheliale Glykokalix. Diese Schicht kleidet luminal das Endothel aller Gefäße aus.

Proteoglykane, Glykoproteine und zu einem geringen Teil Glykolipide bildet den membrangebundenen Teil der Glykokalix. Alle Bestandteile bilden eine filamentöse, kohlenhydratreichen Auskleidung, welche mit den darunter liegenden Endothelzellen assoziiert ist (Dane et al. 2015, 956-966). Proteoglykane sind großmolekulare Substanzen, welche aus 95 % Kohlenhydraten und 5 % Proteinen gebildet werden. Proteoglykane sind Bestandteil der tierischen extrazellulären Matrix und bestehen aus einem Protein und einer oder mehrerer kovalent gebundenen Kohlenhydratgruppen, den Glykosaminoglykanen (GAG). GAG wiederum sind linear, aus sich wiederholende Disaccharide aufgebaute, saure Polysaccharide. Bis zu 90% aller Glykosaminoglykane werden durch Heparansulfat und Hyaluronan abgebildet (Florian et al. 2003, 136-142; Reitsma et al. 2007, 345-359). Mit 50 bis 90 % bilden Heparansulfat-Proteoglykane, unter anderem Syndekan-1, Glypican-1 und weitere, den Hauptbestandteil der endothelialen Glykokalix. Diese Heparansulfat-Proteoglykane sind durch transmembranöse Domäne an den Endothelzellen verankert. Hyaluronon ist ein

weiteres Glykosaminoglykan, welches aber nicht sulfiert und nicht negativ geladen ist. Es interagiert mit speziellen Bindungsproteinen (CD44) oder wird ohne kovalente Bindung in die perizellulär-extrazelluläre Matrix eingebaut (Dane et al. 2015, 956-966). Das Makromolekül Chondroitinsulfat ist ein sulfatiertes Glykosaminoglykan.

Proteine wie Albumin, Fibrinogen, Antithrombin III, aber auch Zelladhäsionsmoleküle und Lipide können mit den Glykosaminoglykanketten interagieren (Kolářová et al. 2014, 1-17). Die Glykoproteine werden dominiert von Zelladhäsionsmolekülen wie E-Selektin, Integrinen und Proteinkomplexe, welche relevant für die Homöostase und die Thrombozytenadhäsion sind. Auch flüssige Komponenten interagieren mit den verankerten Bestandteilen der Glykokalix und bilden somit ein dynamisches Äquilibrium mit dem Blutfluss. Im gesunden Zustand ist die endotheliale Glykokalix eine hochdynamische, aber in sich stabile Struktur, welche durch feine Mechanismen in Balance zwischen normalem Abbau und neuer Biosynthese steht (Gaudette et al. 2020, 117-134). Grundsätzlich ist die Größe der endothelialen Glykokalixschicht im Bereich der Mikrozirkulationsgefäße mit bis zu 0,2 µm am dünnsten und im Bereich größerer Gefäße größer, mit bis zu 8 µm Dicke (Woodcock u. Woodcock 2012, 384-394).

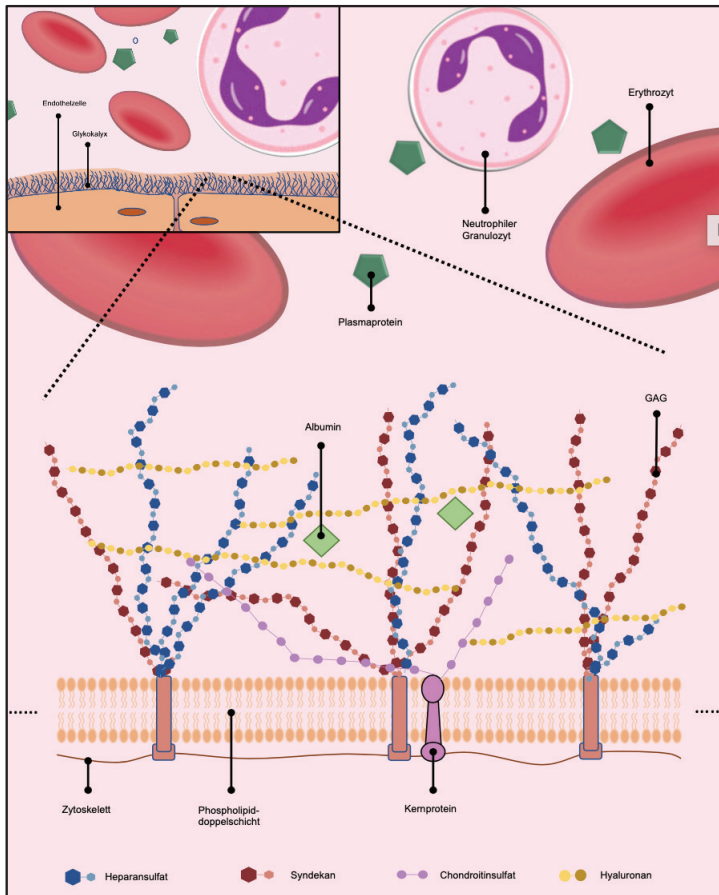


Abbildung 1: Eigene schematische Darstellung, der die Endothelzellen bedeckenden Glyko-
kalixschicht im Gefäßlumen unter physiologischen Bedingungen (links oben). Strukturvergrö-
ßerung (untere Bildhälfte). Die Proteoglykanketten, Heparansulfat und Syndekan sind aus ei-
nem transmembranösen Kernprotein und Glykosaminoglykanketten (GAG) aufgebaut. Sie
interagieren mit Proteinen wie Albumin. Chondroitinsulfat und Hyaluronan ohne transmemb-
ranöse Verankerung werden ebenfalls dargestellt.

2.1.2 Funktion

Die Glykokalix ist adaptiv und spielt eine herausragende Rolle in vielen Aspekten einer normalen Homöostase (Reitsma et al. 2007, 345-359; Goligorsky u. Sun 2020, 791-798). Zu den Aufgaben dieser Struktur zählen unter anderem die Aufrechterhaltung der vaskulären Permeabilität, die Steuerung des transvaskulären Flüssigkeitsaustausches (Woodcock u. Woodcock 2012, 384-394), die Zellkommunikation und die Erfassung rheologisch-physikalischer Signale des Blutes. Darüber hinaus ist die endotheliale Glykokalix an Prozessen der Inflammation und Koagulation beteiligt. Des Weiteren besitzt sie antiadhäsive und antithrombotische Eigenschaften (van den Berg et al. 2006, 75-80). Die Interaktion zwischen Leukozyten des Immunsystems und den Endothelzellen auf der anderen Seite wird durch Präsentation oder Abschirmung zellulärer Signalproteine und chemotaktischer Zytokine durch die endotheliale Glykokalix gesteuert (Rot u. von Andrian 2004, 891-928; Alon u. Shulman 2011, 632-641). Eine Gerinnungshemmung durch die Bindung verschiedener Komponenten wie Antithrombin III als Serinproteaseinhibitor, Faktor Xa und aktiviertes Protein C verleiht der endothelialen Glykokalix herausragende Bedeutung für die Aufrechterhaltung des hämodynamischen Gleichgewichts (Henrich et al. 2010, 917-923; Burke-Gaffney u. Evans 2012, 121). Diese Proteinbindungsfähigkeit beruht auf elektrochemischen Eigenschaften der endothelialen Glykokalix und ihre als „siebartig“ beschriebene Beschaffenheit (Weinbaum et al. 2003, 7988-7995). Im gesunden Zustand sorgt die Glykokalixschicht durch ihr negativ geladenes Molekülnetz als eine Barriere für den vaskulären Flüssigkeitsaustausch. Negativ geladene Moleküle und Moleküle die größer als 70 Kilodalton sind, werden so an der transvaskulären Bewegung gehindert und es kommt zur Generierung eines Albumingradienten. Der interstitielle Raum besitzt oftmals eine ähnliche Proteinkonzentration verglichen mit der Proteinkonzentration des Plasmas. Ein dadurch bedingter kolloidmotischer Gradient im Gefäßsystem entsteht „unterhalb“ der Kohlenhydratstruktur der Glykokalix durch selektive Filtrierung von Proteinen. Dieser Gradient hält Protein und Wasser im Blutgefäßsystem zurück (Chappell et al. 2008, 959-969). Klassischerweise wird von einem durch hydrostatische und onkotische Druckdifferenzen bedingten Nettofluss über eine kapilläre Membran ausgegangen. Im arteriellen Kapillarsystem findet durch Filtration im venösen Kapillaranteil eine Rückresorption von Flüssigkeit statt. Dieses

Filtrationsprinzip wurde von Henry Starling im 19. Jahrhundert beschrieben (Woodcock u. Woodcock 2012, 384-394). Durch die Hypothese des „adversen Starling Mechanismus“ wird postuliert, dass der transvaskuläre Flüssigkeitsaustausch nicht allein einem einfachen Gradienten von onkotischem und hydrostatischem Druck folgt. Die Schicht der endothelialen Glykokalix generiert einen proteinfreien Raum zwischen sich und der endothelialen Zellmembran. Somit ersetzt der „transglykokalix“-onkotische Druck den interstitiellen onkotischen Druck (Woodcock u. Woodcock 2012, 384-394; Dunkel 2020, 790-793). Eine weitere Änderung des Mechanismus mit der sogenannten „no absorption rule“ besagt, dass der onkotische Gradient die Filtration aus dem Interstitium ins Gefäßsystem nicht umkehren kann. Erst durch eine Disruption beider Schichten der Doppelbarriere, der endothelialen Glykokalix und der darunterliegenden Endothelzelle kann eine verstärkte vaskuläre Permeabilität erzeugt werden (Butler et al. 2020, 742-751). Das rheologische Strömungsprofil des Blutes kann durch bestimmte Anteile der endothelialen Glykokalix wahrgenommen werden. Diese fungiert als Messfühler und agiert mit der Anpassung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Produktion. Als Gasotransmitter bedingt Stickstoffmonoxid (NO) eine lokale Vasodilatation. Es sorgt somit für eine lokale Regulation der Durchblutung durch Beeinflussung des peripheren Widerstandes (Thi et al. 2004, 16483-16488; Dull et al. 2007, 1452-1458). Die einzigen Veröffentlichungen über die Glykokalix beim Pferd beziehen sich auf Untersuchungen des Reproduktionstraktes (Desantis et al. 2011, 671-678), mesenchymaler Stammzellen (Desantis et al. 2018, 73-81) und pulmonaler intravasaler Makrophagen (Singh et al. 1994, 235-243). Aus diesem Grund ist es notwendig, Daten aus Spezies fernen Untersuchungen heranzuziehen. Durch die fragile Struktur der Glykokalix, und der unterschiedlichen Dicken, Zusammensetzung und Struktur dieser wird die Erforschung erschwert. Um den Grad der Schädigung zu messen, können zirkulierende Komponenten der Glykokalix dieser im Plasma oder Urin mittels quantitativen Verfahrens analysiert werden. Die Glykokalix bildet zusammen mit den an sie mit ihr gebundenen Plasmaproteine das sogenannte „endothelial surface layer“ (ESL) aus, das mit einer Höhe von 1 µm meist dicker ist als die Endothelzelle selbst (Pries et al. 2000, 653-666). Diese funktionelle, hochdynamische Form der endothelialen Glykokalix stellt die ESL dar (Reitsma et al. 2007, 345-359).

2.2 Makro- und Mikrozirkulation

2.2.1 Makrozirkulation

Als Makrozirkulation wird der Teil des Blutkreislaufes bezeichnet, der sich in den großen Blutgefäßen, Arterien und Venen vollzieht. Der Körperkreislauf bildet als Hochdrucksystem einen Gegensatz zum Lungenkreislauf, der als Niederdrucksystem fungiert. Das arterielle System des „großen“ systemischen Kreislaufs erlaubt einen schnellen Transport und die Verteilung des Blutes zu den Blutkapillaren der Körperperipherie. Die kleinen und großen Venen befördern das Blut zurück zum Herzen und dann weiter in den „kleinen“ Lungenkreislauf. Die Venen dienen als Blutreservoir. Der konvektive Transport des Blutes entlang eines vom Herz erzeugten hydrostatischen Druckgradienten und ein diffusiver Gas- und Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe sind wesentliche Grundpfeiler dieses kardiovaskulären Systems. Die Aktionsphasen der Herzkammern gliedern sich in Anspannungs- und Auswurfphase, der Systole und die Entspannungs- und Füllungsphase, der Diastole. Als Leistungsparameter des kardiovaskulären Systems wird das Herzminutenvolumen angesehen. Das Herzminutenvolumen ist das Volumen, das vom Herzen pro Minute in den Kreislauf eingespeist wird. Errechnet wird das Herzminutenvolumen aus dem Produkt der Herzfrequenz und des Schlagvolumens (Schwarzwald et al. 2009, 37-100).

2.2.2 Messlokalisationen

Die nachfolgenden Messlokalisationen wurden für die Messung der Mikrozirkulations- und peripherer Perfusionsmessungen verwendet.

Zunge

Die Zunge mit dem der freibeweglichen Zungenspitze (Apex linguae) im Cavum oris, dem Zungenkörper (Radix linguae) und der Zungenwurzel (Radix linguae) fügt sich in den Mundhöhlenboden ein. Die Zungenschleimhaut ist durch eine straffe Submukosa, (Aponeurosis linguae) fest mit ihrer Unterlage verbunden.

Die Mukosa wird von drüsenlosem mehrschichtigem Plattenepithel der Mundhöhle bedeckt, das in seinem Differenzierungsgrad variiert (Nickel et al. 2004). Die Rückenfläche der Zunge besitzt eine ausgeprägte Verhornung oberflächlicher Epithelzellen mit Ausbildung eines deutlichen Papillarkörpers. Die Seiten- und Unterfläche der Zunge sind demgegenüber von einem dünnen mehrschichtigen Plattenepithel bedeckt (Liebich et al. 2010, 191-341).

Darm

Der Dünndarm reicht vom Magenpförtner bis zur Hüft-Blind-Grimmdarmgrenze und gliedert sich in Duodenum, Jejunum und Ileum. Das Jejunum, der Leerdarm, ist der längste Abschnitt des Dünndarms. Er beginnt mit der Flexura duodenojejunalis am kranialen Ende der Plica duodenocolica. Von hier ab wird das kraniale Darmgekröse länger und dient den großen Schlingen des Jejunums als Gekröseplatte Ansatz. Beim Pferd finden die sehr beweglichen Schlingen vorwiegend im linken oberen Quadranten der Bauchhöhle Platz. Das Ileum, der Hüftdarm bildet das kurze Endstück des Dünndarms und vermittelt den Anschluss zum Dickdarm. Es hängt an der kaudal auslaufenden Platte des kranialen Gekröses und ist durch die Plica ileocaecalis mit dem Zäkum verbunden. Diese Falte inseriert am antimesenterialen Rand des Ileums und läuft in einem Gekrösestreifen aus, der durch seine Reichweite die Länge dieses Dünndarmabschnitts bestimmt (Nickel et al. 2004). Von innen nach außen finden sich verschieden geschichtete Gewebe. Die Schleimhautschicht (Tunica mucosae) befindet sich luminal, angefügt ist das Unterschleimhautgewebe (Tela submucosa), die Muskelschicht (Tunica muscularis), das Untergewebe der Serosaschicht (Tela subserosa) und die Serosaschicht (Tunica serosa) in zölonhaltigen Körperschichten. Oberflächlich bedeckt ein einschichtiges Plattenepithel die Serosaschicht, das sogenannte Mesothel. Das Mesothel liegt einer dünnen, bindegewebigen Lamina propria serosae als Befestigungs- und Verschiebeschicht auf.

Genital

Die Vorhaut des Penis wird beim Pferd durch eine zusätzliche Plica preputialis zu einer Doppelmanschette. Die „Außenmanschette“ besitzt eine Lamina externa, welche in eine Lamina interna übergeht. Mit ihrem Umschlagsrand begrenzt sie das weite Ostium preputiale. Aus dieser Lamina interna geht die Lamina externa der Plica preputialis hervor. Diese Lamina externa schlägt sich kranial um und begrenzt damit den Anulus preputialis und setzt sich in die Lamina interna der Plica preputialis fort (Nickel et al. 2004). Die Lamina interna wird von einem mehrschichtigen Plattenepithel bedeckt (Liebich et al. 2010, 191-341).

Bei der Stute setzt sich die kutane Schleimhaut der Vagina kaudal in das Vestibulum vaginae fort. Die Vulva wird von den beiden wulstigen Schamlippen gebildet, die in den dorsalen Spitzen und in den ventralen abgerundeten Schamwinkeln auslaufen. Das Integument der Schamlippen sowie die der Rima vulvae zugewendete Schleimhautfläche sind meist pigmentiert (Nickel et al. 2004). Die Schamlippen werden teilweise noch von einer drüsenlosen Schleimhaut (mehrschichtiges Plattenepithel), zum größeren Teil von äußerer Haut überzogen (Liebich et al. 2010, 191-341).

2.2.3 Mikrozirkulation

Mit einem einschichtigen Plattenepithel bildet das Endothel (Endothelium, Angiothel) die innere Auskleidung der Gefäße (Reitsma et al. 2007, 345-359). Es kann durch seine Anpassungsfähigkeit und Plastizität wechselnden Füllungszuständen der Gefäße folgen und durch Poren auch die Permeabilität und damit die Intensität der Stoffwechselvorgänge beschleunigen. Die Mikrozirkulation besteht aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen, die unter einer Größe von 100 Millimeter definiert werden (Reid u. Meyrick 1982, 3-20; Ince 2005, 13-19). Diese Strukturen stellen hinsichtlich ihres Aufbaus und ihrer Funktion eine heterogene Gruppe dar. Der Strömungswiderstand im Lungenkreislauf beträgt nur ein Quantum des totalen peripheren Widerstandes im Körperkreislauf. Der Hauptwiderstand im globalen Kreislauf wird durch Arterien und Arteriolen eingebracht. Diese können aufgrund ihres kleinen Innenradius, im Vergleich den