

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### **1. Versuchsaufbau und Probanden**

In dieser Studie standen insgesamt 20 Pferde aus zwei verschiedenen Reitsportanlagen in Berlin über den Zeitraum eines Jahres zur Verfügung. Es wurden zwei Ställe mit unterschiedlichen Haltungsbedingungen ausgewählt, um so auch haltungsbedingte Einflüsse auf die Hornqualität des Pferdehufes ermitteln zu können. Die Pferde des einen Stalles (Stall 2) wurden ausschließlich in Boxen mit Stroh- oder Späneestreu gehalten, ohne Paddock- oder Weideaufenthalt. Das Futter (Heu, Hafer und handelsübliches Pferdemüsli) wurde auf drei Mahlzeiten pro Tag verteilt. Die Pferde des anderen Stalles (Stall 1) wurden im Winter freilaufend in Gruppen auf Sandpaddocks gehalten und hatten jederzeit freien Zugang zu Heu. Im Sommer wurden diese Pferde ganztägig auf Weiden gehalten. Hafer wurde hier einmal täglich gefüttert. Die Nutzung der Pferde war in beiden Ställen ähnlich: Mit Ausnahme von zwei Privatpferden (Dressurpferde), die täglich eine Stunde bewegt wurden, handelte es sich bei allen anderen Pferden um Schulpferde, welche mehrere Stunden täglich geritten wurden. Es wurden sowohl Pferde mit adspektorisch guter sowie mangelhafter Hornqualität ausgewählt. Diese Auswahl wurde zusammen mit den Pferdebesitzern, Hufschmieden und behandelnden Tierärzten getroffen.

Das Alter der an dieser Studie teilnehmenden Pferde lag zwischen 6 und 22 Jahren. Die Pferde gehörten verschiedenen Rassen und Nutzungsrichtungen an; es handelte sich bei diesen Tieren um sechs deutsche Reitponys, einen Traber, einen Haflinger und zwölf Warmblüter. Die Geschlechtsverteilung in diesen Tiergruppen war etwas ungleichmäßig: vierzehn Wallache und sechs Stuten. Im Stall 2 waren alle Pferde über den gesamten Studienverlauf beschlagen, hingegen waren im Stall 1 fünf Pferde zu Anfang der Studie ohne Hufbeslag. Aufgrund eines neuen Reithallenbodens in dieser Reitsportanlage, welcher eine stark abschleifende Wirkung auf das Hufhorn zeigte, wurden dann auch die Hufe dieser fünf Pferde einen Monat nach Beginn der Studie mit Hufeisen versehen. Die Hufpflege im Stall 2 bestand aus täglichem Säubern der Hufe, regelmäßigem Waschen und Einfetten. Im Stall 1 wurden die Pferdehufe hingegen nur gelegentlich gesäubert.

Ein Pferd aus dem Stall 2 wurde etwa einen Monat nach Beginn der Studie verkauft und schied somit aus der Studie aus. Ein weiteres Pferd desselben Stalles musste aufgrund eines Unfalles nach drei Wochen euthanasiert werden. Aus diesen Gründen wurden zwei weitere Pferde nach einem Monat nachträglich in die Studie aufgenommen. Die Probenentnahme

wurde über den Zeitraum eines Jahres vom Sommer 2003 bis zum Sommer 2004 durchgeführt, um saisonale Einflüsse auf die Hornqualität beurteilen zu können.

### **2. Untersuchungsmaterial und Probenentnahme**

#### **2.1 Hufhornprobenentnahme**

Die Entnahme der Hufhornproben fand im Abstand von sechs bis zehn Wochen über den Zeitraum eines Jahres im Zusammenhang mit der fälligen Hufkorrektur durch einen Hufschmied statt. Die Hufclippings aller Hufe wurden unmittelbar nach der Hufkorrektur durch den Hufschmied gesammelt, grob gesäubert, um Feuchtigkeitsverluste zu vermeiden in Gefrierbeuteln luftdicht verpackt und daraufhin bei -28 °C tief gefroren gelagert. Leider konnten nicht an jedem Termin von allen Pferden resp. von allen vier Hufen Hornproben gesammelt werden, da die Hornbildungsrate der meisten Pferde im Winter stark reduziert war. Weiterhin war durch einen neuen Reithallenboden, der eine abschleifende Wirkung auf das Hufhorn hatte, das Sammeln von Hufclippings im Stall 2 über einen Zeitraum von drei Monaten nur bedingt möglich.

#### **2.2 Blutproben**

Blutproben aller Pferde wurden zum Zwecke einer Mineralstoff- und Spurenelementanalyse zu Beginn der Studie, nach sechs Monaten und am Ende der Studie untersucht. Aus Gründen des Tierschutzes und der Vermeidung unnötiger Belastungen für die Tiere wurde hierfür auf Blutproben zurückgegriffen, die gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes „nach erprobtem Verfahren zum Zweck der Erkennung von Krankheiten oder Körperschäden“ durch den behandelnden Tierarzt ohnehin gezogen wurden. Folgende Blutparameter wurden bestimmt: Natrium, Kalium, Kalzium, ionisiertes Kalzium, Phosphat, Eisen, Magnesium, Kupfer, Selen und Zink. Zur Blutprobennahme wurden Serumgel Röhrchen (Monovetten, Firma Sarstedt, Nümbrecht) verwendet. Die Vollblutproben zur Untersuchung von ionisiertem Kalzium wurden in Heparinplasmarröhrchen (Monovetten, Fa. Sarstedt, Nümbrecht) gesammelt. Die Vollblutproben wurden innerhalb von zwei Stunden nach Probenentnahme untersucht. Die Serumproben wurden innerhalb von zwei Stunden nach der Blutentnahme zentrifugiert (Zentrifugentyp Rotina 46 RS, Fa. Hettich, Tuttlingen) und das Serum bis zur weiteren Untersuchung bei -41°C tiefgefroren gelagert.

### **2.3 Futtermittelproben**

Das Grundfutter aller an dieser Studie teilnehmenden Pferde bestand aus Heu und Hafer. Im Stall 1 wurden Proben dieses Grundfutters zu Anfang, nach sechs Monaten und zum Ende der Studie zum Zwecke einer Fettsäureanalyse gesammelt, in Gefrierbeuteln verpackt und wenige Stunden nach der Probenentnahme untersucht, um Einflüsse durch die Zusammensetzung des Grundfutters auf die Versorgung des Pferdes bzw. der Hufe durch diese Stoffe bestimmen zu können.

## **3. Fotografische Dokumentation**

### **3.1 Fotografische Dokumentation der Pferdehufe**

Um die klinisch signifikanten Veränderungen der Hornqualität beurteilen zu können, wurden die Hufe aller Pferde zu Beginn der Studie, nach sechs Monaten und zum Ende der Studie fotografiert. Vorab wurden die Pferde auf einen geraden, sauberen Untergrund verbracht und die Hufe gründlich mit Wasser gereinigt und dann getrocknet. Pro Huf wurden fünf Fotos angefertigt und dabei die dorsale, laterale, mediale, palmare bzw. plantare und distale Ansicht eines jeden Hufes dokumentiert. Für die fotografische Dokumentation standen eine Minolta Dimage X und eine Nikon Coolpix 5700 Digitalkamera zur Verfügung. Anhand der Huffotos wurde ein anonymisiertes „Hufscoring“ durchgeführt, um die Hornqualität objektiv beurteilen zu können. Es wurde zunächst eine Skala von 0 bis 3 zu Hilfe genommen, um jeden Horndefekt einzeln zu beurteilen (siehe Beurteilungsschema). Danach wurden die Horndefekte aufgrund der klinischen Bedeutung für die Funktion des Pferdehufes unterschiedlich stark gewichtet (siehe Tabelle 9). Danach wurde für jeden Defekt separat der jeweilige Wichtungsfaktor mit den vorher zugeteilten Noten multipliziert und dann die Noten der einzelnen Defekte addiert und von dem Maximalwert 100 abgezogen, so dass sich für jeden beurteilten Huf letztlich eine Einzelnote zwischen 0 und 100 ergab, wobei 100 einen Huf ohne erkennbare Defekte beschreibt.

#### **Beurteilungsschema für die Horndefekte:**

0 = keine Veränderung

1 = geringgradiger Defekt

2 = mittelgradiger Defekt

3 = hochgradiger Defekt

**Tabelle 9: Bewertungsskala für das Hufscoring**

| Art der Hufdefekte         | Wichtung<br>(Berechnungsfaktor) |
|----------------------------|---------------------------------|
| oberflächliche Hornspalten | 0,1                             |
| durchgehende Hornspalten   | 0,2                             |
| Tragrandausbrüche          | 0,15                            |
| Hornringe                  | 0,1                             |
| Verformungen des Hufes     | 0,2                             |
| Verfärbungen des Hufes     | 0,05                            |
| ausgerissene Nagellöcher   | 0,15                            |
| Hornschuppen               | 0,05                            |

### 3.2 Fotografische Dokumentation der entnommenen Hufclippings

Die im Verlaufe des Hufbeschlages bzw. der Hufkorrektur gesammelten Hufclippings wurden wenige Stunden nach der Probenahme fotografiert, um bei den histologischen Untersuchungen Trocknungs- und Schneideartefakte ausschließen und um die gleiche Stelle im Hufhorn bei der nächsten Probenaufbereitung wieder finden zu können. Dazu wurden die Hufclippings zunächst gesäubert und die Stellen markiert, die für die histologischen Untersuchungen entnommen werden sollten.



**Textabb. 8:**

**Im Rahmen der Probenentnahme gesammeltes Hufclipping einer Warmblutstute aus dem Stall 2**

### **3.3 Fotografische Dokumentation der Hornblöckchen**

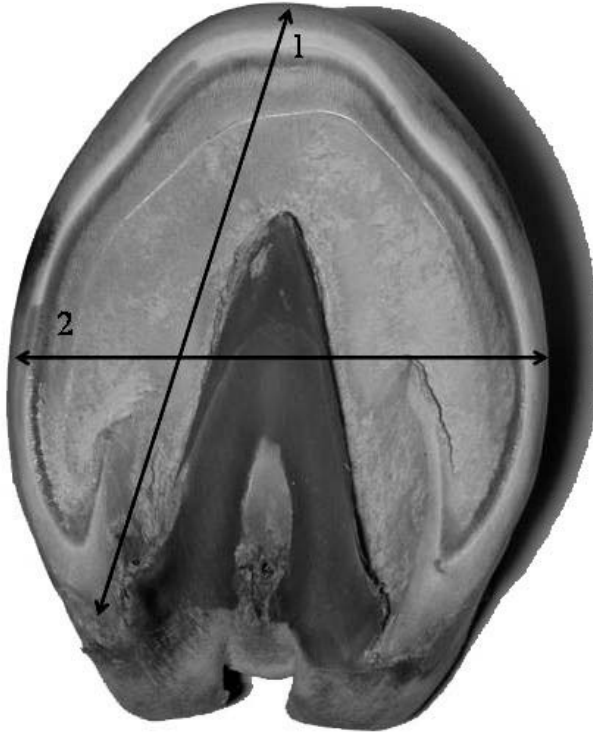
Die für die histologischen Untersuchungen zur Herstellung von Nativschnitten auf Holzblöckchen aufgeklebten Hornproben wurden ebenfalls fotografiert. Ziel war es, vorhandene Risse und andere Defekte im Horn zu dokumentieren, um diese bei den folgenden histologischen Untersuchungen von Trocknungs- und Schneideartefakten, wie sie bei der histologischen Aufarbeitung zur Herstellung der gefärbten Schnitte entstehen könnten, zu unterscheiden.

### **4. Bestimmung von Vorderwandwinkel, Huflänge, Hufbreite und Trachtenhöhe**

Im Rahmen der Probennahme der Hufclippings wurden im Abstand von acht Wochen der Zehenwandwinkel, die Hufbreite, die Huflänge und die Trachtenhöhe der Hufe aller Pferde gemessen und protokolliert, um Änderungen der Hufmaße zu dokumentieren. Diese Dokumentation fand nur nach der Hufkorrektur bei abgenommenem Hufeisen statt, da eine Messung vor und nach der Hufkorrektur nicht mit dem Arbeitsablauf der Hufschmiede zu vereinbaren war. Die Pferde standen dabei auf einem festen, sauberen Untergrund. Die Winkelmaße sowie die Hufbreite und die Huflänge wurden am aufgehobenen Huf bestimmt, die Trachtenhöhe dagegen am abgestellten Huf. Der Vorderwandwinkel wurde mittels eines handelsüblichen Hufwinkelmessers bestimmt. Die Hufbreite wurde an der weitesten Stelle, die Huflänge vom Eckstrebenwinkel, entlang des Strahlschenkels zum gegenüberliegenden Punkt des Tragrandes und die Trachtenhöhe vom Boden zum Haaransatz der Trachte mit einem herkömmlichen Maßband gemessen.

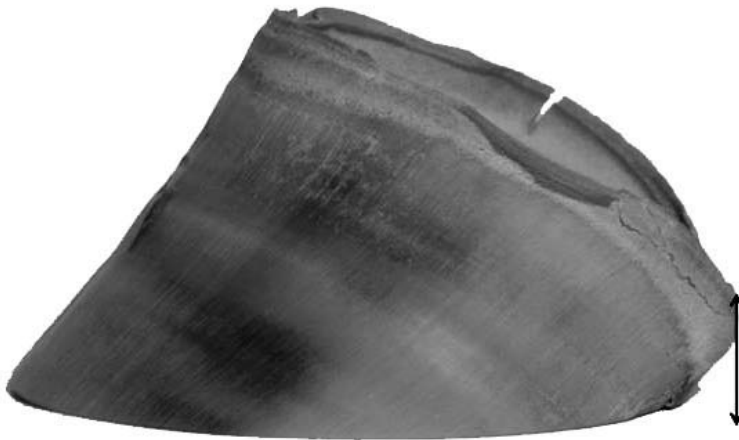


**Textabb. 9:**  
**Ermittlung des Vorderwand-**  
**winkels mit Hilfe eines Huf-**  
**winkelmessers, laterale Auf-**  
**nahme**



**Textabb. 10:**

**Strecken zur Ermittlung der  
Huflänge (1) und Hufbreite (2),  
distale Aufnahme**



**Textabb. 11:**

**Strecke zur Ermittlung  
der Trachtenhöhe, laterale  
Aufnahme**

### **5. Bestimmung der Hornbildungsrate**

Die monatliche Hornbildungsrate konnte nur beispielhaft bei zwei Pferden aus dem Stall 1 an jeweils einem Huf bestimmt werden, da sich die Pferdebesitzer nicht dazu bereit erklärten, Markierungen an den Hufen ihrer Pferde vorzunehmen. Diese beiden Pferde wiesen allerdings eine horizontale Hornspalte bzw. eine Trittsverletzung am Huf auf, sodass der Abstand dieser Defekte zum Kronrand als Ausgangspunkt für die Messung der Hornbildungsrate verwendet werden konnte. Der Abstand dieser Horndefekte zum Kronrand wurde im Rahmen der Probennahme mit einem handelsüblichen Maßband vermessen.

## **6. Bestimmung des Körpergewichtes**

Zur Bestimmung des Körpergewichtes der Pferde wurde ein handelsübliches Wägebänder für Pferde und Ponys, das auf Höhe des Widerristes um den Rumpf des Pferdes gelegt wird und auf dem das Gewicht anhand einer Skala abgelesen werden kann, verwendet. So wurde das Körpergewicht aller an der Studie teilnehmenden Pferde und Ponys dreimal im Abstand von sechs Monaten, ermittelt.

## **7. Physikalische Materialprüfung**

### **7.1 Bestimmung des Wassergehaltes im Hufhorn**

Zur Bestimmung des Wassergehaltes im Hufhorn wurde aus den gesammelten Hufclippings aus dem mittleren Kronhorn der Zehe, dem der Seitenwand und dem des Trachtenteiles jeweils ein Hornblöckchen von ca. 10 mm x 10 mm x 5 mm Größe herausgeschnitten. Mittels einer Feinanalysenwaage (AE 160, Fa. Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe) wurde das Ausgangsgewicht der Hornproben ermittelt. Diese wurden dann bei 50° C für etwa zehn Tage in einem Brutschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Hierzu wurden die Blöckchen alle zwei Tage gewogen, bis keine Veränderungen des Gewichtes mehr feststellbar waren. Der physiologische Wassergehalt der Hornproben konnte anschließend nach folgender Formel aus dem Gewichtsverlust berechnet werden:

Berechnung des physiologischen Wassergehaltes einer Hornprobe in Prozent:

$$W (\%) = (A - Tr/A) \times 100$$

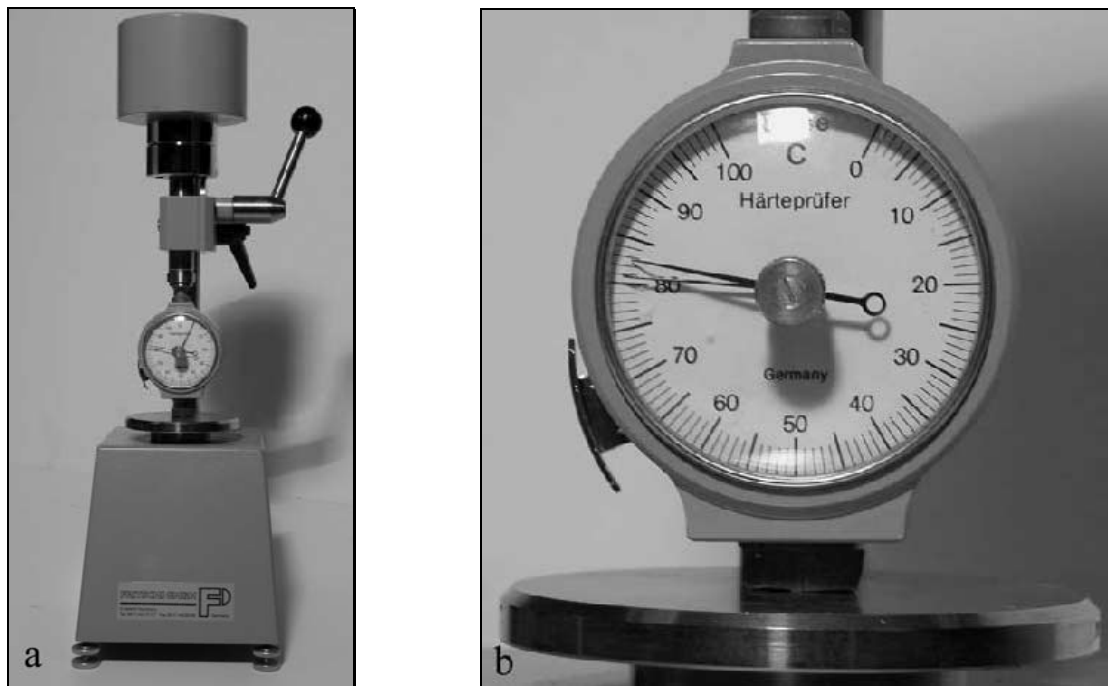
mit W = Wassergehalt (%), A = Ausgangsgewicht der Hornprobe und Tr = Gewicht der Hornprobe nach Trocknung bei 50 °C bis zur Gewichtskonstanz

### **7.2 Bestimmung der Hornhärte**

Die Hornhärte wurde vor und nach der Trocknung der Hornproben mittels eines SHORE-C-Härteprüfgerätes (Fa. Fritsch GmbH, Nürnberg) bestimmt. Dieses misst den Widerstand eines Materials gegen das Eindringen einer kegelförmigen Stahlspitze, wobei die Eindringtiefe das Maß der Hornhärte bestimmt. Die Anpresskraft, die über eine Feder im Prüfgerät konstant gehalten wird, beträgt 50 Newton. Das geeichte Gerät, welches in einen Prüfstander eingespannt wird, entspricht der amerikanischen Norm ASTM D 2240. Die gemessene Härte wird in Shore-Einheiten von 0 bis 100 angegeben, wobei 0 der minimalen und 100 der maximalen messbaren Härte entspricht. Die auch häufig verwendeten SHORE-D-Härtemessgeräte arbeiten nach dem gleichen Prinzip, allerdings weisen diese einen spitzeren

Prüfkegel auf, welcher leichter in Risse des Hufhornes oder in den Markraum eines Hornröhrchens eindringen und so die Messergebnisse verfälschen könnte.

Für die Härtegradmessung nach Shore-C wurde aus allen gesammelten Hufclippings nach den Vorgaben zur standardisierten Messung ein mindestens 10 mm x 15 mm x 6 mm großes Hornblöckchen aus dem Kronhorn der Zehe herausgeschnitten und plan geraspelt. Dies war nicht bei jeder Probe möglich, da die genannten Mindestmaße für die Probengröße eingehalten werden müssen, um standardisierte Messergebnisse zu erhalten. Weiterhin war die Messung nach der Trocknung nicht immer durchführbar, da sich einige Proben durch den Feuchtigkeitsverlust verformten und so keine plane Messfläche mehr aufwiesen. In der Mitte der Messfläche (mittleres Kronhorn) wurden je drei aufeinander folgende Messungen durchgeführt und daraus der Mittelwert errechnet. Da Horn ein Material mit viskoelastischen Eigenschaften ist (LANDEAU et al., 1980), wurde nicht der Maximalausschlag gewertet, sondern das Ergebnis nach jeweils drei Sekunden auf der Skala abgelesen. Die Messungen wurden parallel zur Hornröhrchenachse durchgeführt, da dies der natürlichen Druckbelastung des Kronhornes beim Fußen des Hufes entspricht.



**Textabb. 12:**

**In den Prüfstander eingespanntes Shore-C-Härtemessgerät (a), Detailansicht des Shore-C-Härtemessgerätes und eines Hornblöckchens während der Härtemessung (b)**



## **8. Methoden der Probenaufbereitung für die lichtmikroskopischen Untersuchungen**

Im Rahmen der lichtmikroskopischen Untersuchungen wurde das Hufhorn von insgesamt 20 Pferden histologisch untersucht. Für eingehende histologische Untersuchungen wurden daraufhin aus jedem der beiden Ställe je ein Vorder- und ein Hinterhuf zweier Pferde exemplarisch ausgewählt und jeweils die Proben von drei Terminen (Sommer 2003, Winter 2003/2004, Sommer 2004) histologisch analysiert. Dabei wurden die Hufe der vier Pferde genauer untersucht, bei denen in der Summe der übrigen Untersuchungen die größten Veränderungen im Laufe eines Jahres auftraten. Insgesamt wurden 24 Hornproben für diese detaillierte Analyse herangezogen.

### **8.1 Herstellung der Nativschnitte**

Nach der Entnahme der Proben für die physikalische Materialprüfung wurden aus dem Zehenteil der gesäuberten Hufclippings je etwa 1 cm breite Hornblöckchen mit Hilfe einer herkömmlichen Gartenschere herausgeschnitten. Die entnommenen Hornblöckchen bestanden aus Kronhorn, weißer Linie und teilweise aus Sohlenhorn. Für die genaueren histologischen Untersuchungen wurden exemplarisch jene Pferde ausgewählt, bei denen aufgrund der Ergebnisse der physikalischen Materialprüfung, des Hufscorings, der Vermessung der Hufdimensionen und der Blutparameter die signifikantesten Veränderungen im Verlaufe des Versuchszeitraumes feststellbar waren. Die entnommenen Hornblöckchen wurden dann mittels eines Zweikomponenten-Epoxydharzklebers quer zur Röhrenachse auf kleine Holzblöckchen aufgeklebt und für 48 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden ohne weitere Vorbehandlung an einem Tetrander (Fa. Reichert-Jung, Heidelberg) mit einem D-Messer quer zum Verlauf der Hornröhrenachse Horizontalschnitte mit einer Dicke von 6 bis 7  $\mu\text{m}$  angefertigt, mit einer Pinzette vom Messer abgenommen und zur kurzzeitigen Aufbewahrung bis zur Färbung in destilliertem Wasser aufgefangen. Auf diese Weise wurden von jedem Hornblöckchen aus dem oberen Drittel, der Mitte und aus dem unteren Drittel Serienschnitte (30 Schnitte in Folge) hergestellt. Anschließend wurden diese histologischen Schnitte flottierend gefärbt und auf Objektträger aufgezogen.

### **8.2 Histologische Übersichtsfärbung**

Als histologische Übersichtsfärbung wurde die Hämalaun-Eosin (H/E)-Färbung (ROMEIS, 1989) verwendet. Saure, basophile Strukturen wie die Nukleinsäuren im Zellkern und in Ribosomen und die Keratohyalingranula im Stratum granulosum werden durch Hämalaun (nach MAYER) blau gefärbt. Die Gegenfärbung mit Eosin (0,5 %ige wässrige Eosin-Lösung)

stellt basische, acidophile Strukturen rötlich dar. Die Nativschnitte wurden in Hämalaun für zehn Minuten gefärbt, dann in Aqua dest. gespült, für weitere zehn Minuten zum Bläuen in lauwarmes Leitungswasser verbracht und anschließend mit Eosin gegengefärbt und dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Eukitt® (Fa. Kindler, Freiburg) eingedeckelt.

### 8.3 Histochemische Nachweisverfahren

#### 8.3.1 Nachweis von Glykogen und Zuckeranteilen in Lipiden und Proteinen

Die Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion) nach McMANUS (ROMEIS, 1989) dient dem semiquantitativen Nachweis von Glykoproteinen und Glykolipiden im Bereich der Zellgrenzen, insbesondere im Interzellularkitt, und dem Nachweis von Glykogen im Zytoplasma der Epidermiszellen. Hierzu wurden die Schnitte für fünf Minuten in Perjodsäure verbracht, dann in Aqua dest. gespült und daraufhin für 30 Minuten in Schiffischem Reagenz gelagert. Nach zehnmütigem Wässern und kurzem Spülen in Aqua dest. wurde eine Kerngegenfärbung mit Hämalaun nach MAYER durchgeführt. Die PAS-positiven Strukturen färben sich rosa bis purpurrot oder violett, schwach positive hellrosa, wohingegen PAS-negative Strukturen farblos bleiben. Durch die Perjodsäure werden die benachbarten Hydroxylgruppen der Zucker zu Aldehydgruppen oxidiert, welche dann durch das Schiffische Reagenz angefärbt werden.

#### 8.3.2 Nachweis von Lipiden in Geweben

Die Färbung mit Nilblausulfat nach LORRAIN SMITH (Modifikation nach KLEEGER) dient der Unterscheidung von Neutralfetten und anderen Fettstoffen (PALLASKE u. SCHMIDEL, 1959; ROMEIS, 1989). Zuerst wurden die zuvor in Aqua. dest. gewässerten Nativschnitte für 20 Minuten in Nilblausulfat gefärbt und im Anschluss an ein Spülen in Aqua. dest. zwei Minuten lang in 1 %iger Essigsäure differenziert und dann etwa eine Stunde in Leitungswasser gewässert. Mit Hilfe dieser Färbemethode werden Neutralfette rosa dargestellt, Fettsäuren und andere Fettsubstanzen blauviolett. Die Zellkerne erhalten bei diesem Färbeverfahren einen dunkelblauen Farbton.

#### 8.3.4 Auswertung der angefertigten histologischen Präparate

Die Auswertung der angefertigten histologischen Präparate erfolgte an einem Mikroskop, Typ „Axioskop“ (Fa. Zeiss, Jena). Die lichtmikroskopischen Abbildungen konnten mit der

Mikroskopkamera „Prog/Res/3012“ (Fa. Kontron Elektronik, München) direkt zu einem Personalcomputer übertragen werden. Die Angaben zur Vergrößerung der histologischen Bilder ergaben sich dabei aus der Primärvergrößerung (Vergrößerung des Objektivs, 2,5x, 5x oder 10x), multipliziert mit der Sekundärvergrößerung (Vergrößerung des Linsensystems im Fototubus und in der digitalen Kamera, 12,5x). Zur digitalen, Computer gestützten Bildbearbeitung wurde die Bildbearbeitungssoftware „Photoshop“, Version 7.0 (Fa. Adobe, San José/USA) verwendet. Um Veränderungen bzw. eine Konstanz der Architektur des Hufhornes zu dokumentieren, wurden in den histologischen Schnitten unterschiedlicher Probenentnahmezeiträume immer dieselben Hornröhrchen vermessen. Dabei wurden die Durchmesser der Hornröhrchen mit Hilfe eines Lineals der Bildbearbeitungssoftware „Photoshop“, Version 7.0 (Fa. Adobe, San José/USA) ausgemessen und dabei stets histologische Aufnahmen der gleichen Vergrößerung gewählt. Dabei handelt es sich um einen in diesem Programm integrierten Maßstab, anhand welchem bei jeweils gleicher Vergrößerung der untersuchten histologischen Schnitte die Maße der Hornröhrchen ermittelt werden konnten.

## **9. Methoden für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen**

### **9.1 Gerichteter Gefrierbruch**

Aus den zuvor gereinigten Hufclippings wurde ein etwa zwei Zentimeter breites Stück Horn aus dem Zehenteil des Kronhorns und der weißen Linie herausgeschnitten. Die Hornblöckchen wurden daraufhin in flüssigem Stickstoff schockgefroren, mit Hilfe zweier Zangen zunächst parallel, dann quer zur Hornröhrchenlängsachse gebrochen und danach in einem Brutschrank getrocknet. Für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden exemplarisch die Hufe jener vier Pferde aufbereitet, die auch zur genaueren histologischen Untersuchung herangezogen wurden.

### **9.2 Herstellung der Präparate zur rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung**

Die gebrochenen und getrockneten Hornproben wurden mittels des elektrisch leitfähigen Klebstoffes Leit-C nach Göcke (Fa. Plano, Marburg) auf kleine Aluminiumteller geklebt und dann in einem Kathodenzerstäubungsgerät (Fa. Polaron, Watford/England) mit Gold in einer Schichtdicke von 50 nm besputtert. Die Befunderhebung und fotografische Dokumentation der Bruchflächen der Proben wurden am institutseigenen Rasterelektronenmikroskop DSM

(Digital Scanning Microscope) 950 (Fa. Zeiss, Jena) untersucht und die Aufnahmen auf einen Personalcomputer übertragen.

### **10. Fettsäureanalyse**

#### **10.1 Fettsäureanalyse im Hufhorn**

Zur Bestimmung von Fettsäuren im Hufhorn wurden die tiefgefrorenen Hornproben mit Hilfe einer Feile zu feinem Pulver zerrieben. Die Einwaage des Hornpulvers betrug jeweils 100 mg. Dieses Hornpulver wurde mittels Gaschromatographie quantitativ analysiert (SCHÄFER, 1998; SCHÄFER et al, 2001). Zunächst wurde eine quantitative Extraktion der Bestandteile durchgeführt, wobei eine Mehrfachextraktion notwendig war. Die Quantifizierung wurde nach der „Internen-Standard-Methode“ vorgenommen. Dabei wurden die Proben in einem „horizontal Shaker“ (Reax 2000, Fa. Heidolph, Schwabach) ständig geschüttelt. Dem Hornpulver wurde zum Zwecke der Extraktion der Fettsäuren zunächst 4 ml eines Gemisches aus Hexan und Isopropanol im Mischungsverhältnis 3:2 zugefügt. Dann wurde das Lösungsmittelgemisch abzentrifugiert und zu dem Rückstand 1,5 ml eines Gemisches aus Hexan und Isopropanol im Verhältnis 1:1 hinzugegeben. Nach erneutem Abzentrifugieren dieses Lösungsmittels wurde nochmals 1,5 ml eines Gemisches aus Hexan und Isopropanol, diesmal im Verhältnis 2:3, hinzugefügt und so schließlich das Untersuchungsmaterial auf 1 ml eingeeengt. Daraufhin wurde eine Methylierung des Probenrückstandes vorgenommen. Dem aliquoten Teil von 100 µl wurden 50 µl Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH, 0,2 M in Methanol, Fa. Macherey-Nagel, Düren) und 20 µl Interner Standard zugegeben. Der so genannte Interne Standard (IS) hat gleiche oder ähnliche chemische Eigenschaften, wie der zu untersuchende Stoff, aber eine unterschiedliche Retentionszeit. Dieser wird vor der Probenaufbereitung in einer bekannten Konzentration zugegeben. Da die eingesetzte Stoffmenge (Konzentration) des IS bekannt ist, lässt sich die Menge des zu untersuchenden Stoffes aus dem Verhältnis beider bestimmen. Die Proben mit den so entstandenen Fettsäuremethylester wurden unter Zuhilfenahme eines automatic samplers (HP 7673 A) in einen Gaschromatographen (Typ 6890, Hewlett-Packard, Palo Alto/USA) injiziert. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl. Der Gaschromatograph ist mit einer 50 m Sil 88 Kapillarsäule (Fa. Chrompack, Middelburg/Niederlande) mit einem Innendurchmesser von 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,20 µm ausgestattet, um die Fettsäuremethylester zu separieren. Als Trägergas diente Helium mit einer Flussrate von 0,85 ml/min. Die Fettsäuregehalte wurden in g/kg Trockenmasse angegeben.

## 10.2 Fettsäureanalyse in Futtermitteln

Parallel zur Fettsäureanalyse der Hornproben wurden die Fettsäuren in Heu- und Haferproben mittels Gaschromatographie analysiert. Hier reichte eine einfache Extraktion mit 4 ml Isopropanol aus. Das weitere Vorgehen entsprach dem der Fettsäureanalyse des Hornpulvers.

## 11. Mineralstoff- und Spurenelementanalyse im Blut

In den Blutproben wurden Natrium, Kalium, Kalzium, ionisiertes Kalzium, Phosphor, Eisen, Magnesium, Kupfer, Selen und Zink bestimmt.

- *Ionisiertes Kalzium* wurde mittels des ABL 505 (Fa. Radiometer, Kopenhagen/Dänemark) gemessen. Das Gerät ist mit einer ionensensitiven Elektrode ausgestattet, welche eine PVC-Membran (die einen Kalziumionenaustauscher enthält) und eine Zellophan-Membran (welche vor einer Proteinkontamination schützt) besitzt. Zwischen Mantel und Elektrode wird ein Elektrolyt mit bekannter Konzentration an ionisiertem Kalzium eingeschlossen. Wenn die Probe mit der Elektrode in Verbindung gebracht wird, bildet sich über der PVC- und Zellophanmembran ein Potential, welches vom Unterschied zwischen Kalziumkonzentration des Elektrolyts und der Probe abhängt. Ist die Konzentration beider Lösungen identisch, beträgt das Potential 0 Volt. Im ABL 505 wird das so gemessene elektrische Potential in eine mmol-Skala zur Bestimmung der Ca-Konzentration umgewandelt.

- *Kalzium, Phosphor, Eisen und Magnesium* wurden spektrophotometrisch mit Hilfe des Photometers Dimension<sup>®</sup> RXL Max (Fa. Dade Behring, Deerfield/USA) untersucht.

- Eisen: Unter sauren Bedingungen wird an Protein gebundenes Eisen durch das reduzierende Agens Ascorbinsäure freigesetzt. Das so entstandene  $\text{Fe}^{2+}$  bildet einen blauen Komplex mit dem Chromophor Ferene<sup>®</sup>. Die Extinktion des bei einer Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 600 nm bis 700 nm gemessenen Komplexes ist der Konzentration des an Transferrin gebundenen Eisens im Serum direkt proportional.

- Kalzium reagiert mit o-Kresolphthalein-Komplexon unter Bildung eines purpurfarbenen Komplexes. Die Menge des gebildeten Komplexes ist proportional zur Kalziumkonzentration und wird durch eine Zwei-Filter-Endpunkt-Technik (577 nm - 540 nm) photometrisch gemessen.

- Magnesium: Bei dieser Methode bildet Methylthymolblau-Bariumsalz mit Magnesium einen blauen Komplex. Die Menge des gebildeten Komplexes ist proportional zur

Magnesiumkonzentration und wird mit einer Endpunkt-Technik bei 510 nm und 600 nm photometrisch gemessen.

- Phosphor: Anorganisches Phosphat verbindet sich in saurer Lösung mit Molybdat zu einem Komplex (Phosphomolybdat), der durch p-Methylaminophenylsulfat und Bisulfit reduziert wird. Die Extinktion der reduzierten Phosphomolybdat-Lösung bei 340 nm ist proportional zur Konzentration des anorganischen Phosphors und wird wiederum mit Hilfe einer Zwei-Filter-Endpunkt-Technik bei 340 nm photometrisch gemessen.

Die Bestimmung von *Natrium* und *Kalium* wurde mit Hilfe eines klinisch-chemischen Analysensystems (Dimension<sup>®</sup> RXL Max mit QuickLYTE<sup>®</sup>-Modul, Fa. Dade Behring, Deerfield/USA) durchgeführt. Bei dieser Messtechnik wird im Prüfgerät ein elektrisches Potential entwickelt, welches proportional zur Aktivität der Ionen in der Serumprobe ist. Drei der vier im Gerät vorhandenen Elektroden reagieren ionenselektiv auf Natrium- und Kaliumionen. Die vierte Elektrode dient als Referenzelektrode. Wird nun eine Probe in das Gerät gegeben, stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Natrium- oder Kaliumionen und der Elektrodenoberfläche ein. Das erzeugte Potential ist proportional zum Logarithmus der Analytenaktivität in der Probe. Das entstehende elektrische Potential der Probe wird proportional zum Potential einer Standardlösung gemessen. Die Konzentration des jeweiligen Ions wird in diesem Gerät aus dem elektrischen Potential mittels der Nernst-Gleichung berechnet.

• *Zink*, *Kupfer* und *Selen* wurden atomabsorptionsspektrometrisch bestimmt. Das Prinzip aller AAS-Varianten (Atomabsorptionsspektrometrie) ist die Erzeugung freier Atome (sog. Atomisierung) des zu bestimmenden Elements und deren Bestrahlung mit elektromagnetischer Strahlung geeigneter Wellenlänge. Diese elektromagnetische Strahlung wird durch Hohlkathoden- oder elektrodenlose Entladungslampen erzeugt, deren Strahlungsquellen das jeweils zu bestimmende Element enthalten. Von den Atomen der Probe wird diese Strahlung absorbiert.

- Zink wurde mittels Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie analysiert. (AAS 1100, Fa. Perkin Elmer, Wellesley/USA). Diese Methode beruht auf dem Prinzip des Überganges von Atomen eines Elementes aus dem Grundzustand in definierte angeregte Zustände durch Absorption von Strahlung bestimmter Wellenlängen. Die zu analysierende Probe wird durch thermische Energie atomisiert und der so entstandene Atomdampf mit Licht einer bestimmten

## Material und Methoden

Wellenlänge durchstrahlt und so die Atome angeregt. Die Extinktion ist der Zinkkonzentration proportional. Die Messung von Zink erfolgte bei einer Wellenlänge von 213,9 nm.

- Der Kupfergehalt wurde mittels Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie (AAS 1, Carl Zeiss, Jena) bestimmt. Zunächst wurden die zu analysierenden Serumproben um den Faktor 7 mit Aqua dest. verdünnt. Diese wässrige Lösung wurde dann mit Hilfe von Pressluft zerstäubt und in Aerosolform in einen Glaskolben verbracht. Dann wurde ein Brenngas (Acetylen) hinzugegeben und zusammen mit Luft verbrannt, um Energie zur Spaltung der Kupferverbindung in atomares Kupfer aufzubringen. Danach wurde die Flamme, in der nun Kupfer in atomarer Form vorlag, mit Licht in einer Wellenlänge von 324,8 nm durchstrahlt. Dabei trifft das Licht auf ein Kupferatom und wird von diesem absorbiert. Je höher die Atomkonzentration ist, desto höher ist folglich auch die Absorption. Diese Lichtdifferenz wurde daraufhin im AAS 1 elektronisch ausgewertet.

- Die Selenanalyse wurde mittels der Hydrid-Atomabsorptionsspektrometrie (AAS 4, Fa. Analytik, Jena) durchgeführt. Vorab wurden die Serumproben unter Zuhilfenahme eines konzentrierten Säuregemisches (30 ml konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 30 ml konz.  $\text{HClO}_4$ , 120 ml konz.  $\text{HNO}_3$ ) aufgeschlossen. Dazu wurde zu 0,1 ml Serum 1 ml dieses Säuregemisches hinzugegeben und dieses Gemisch langsam auf 220 °C erhitzt. Daraufhin wurden die Proben, in denen das Selen nun in der Oxidationsstufe + 6 ( $\text{Se}^{6+}$ ) vorlag, langsam abgekühlt. Als Nächstes wurde eine Reduktion des Selens zur Oxidationsstufe +4 ( $\text{Se}^{4+}$ ) vorgenommen. Dazu wurde zur Probe 2 ml einer 3-molaren HCl-Lösung und  $\text{H}_2\text{SO}_4$  hinzugegeben und dieses Gemisch auf 100 bis 110 °C erhitzt und in ein Reaktionsgefäß, bestehend aus Teflon, verbracht. Zudem wurde ein Trägergas (Argon) in das Reaktionsgefäß geleitet. Als nächster Schritt wurde eine  $\text{NaBH}_4$ -Lösung (15 g  $\text{NaBH}_4$  und 5 g NaOH, aufgelöst in 500 ml Wasser) angesetzt, die mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe in das Reaktionsgefäß geleitet wurde.  $\text{NaBH}_4$  ist ein starkes Reduktionsmittel und ein Hydridgenerator (d. h. es gibt H-Atome ab), welches  $\text{SeH}_2$  (Selenwasserstoff) in atomares Selen und  $\text{H}_2$  spaltet. Das so entstandene atomare Selen wurde nun über den Argonstrom in die im AAS 4 befindliche Quarzküvette verbracht, durch die zum Zwecke der Messung Licht mit einer Wellenlänge von 196 nm geleitet wurde. Die Messung der Selenkonzentration der Proben erfolgte dann automatisch.

## **12. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit Hilfe der Computerprogramme EXCEL<sup>®</sup> 2003 (Microsoft, Redmont/USA) und SPSS<sup>®</sup> für Windows (Version 12,0; Fa. SPSS GmbH Software, München) durchgeführt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte rein deskriptiv. Eine schließende statistische Auswertung wurde nicht durchgeführt, da es sich bei den Pferden nicht um eine repräsentative Stichprobe einer wohldefinierten Grundgesamtheit handelte. Die Darstellung der Daten erfolgte sowohl in tabellarischer als auch in grafischer Form als Boxplots oder in Form von Streudiagrammen. Dabei muss beachtet werden, dass anhand der erhobenen Daten lediglich eine Aussage über die 20 in dieser Studie untersuchten Pferde getroffen werden soll und eine Verallgemeinerung nicht zulässig ist.

Zur numerischen Charakterisierung der Datenmengen wurden folgende Kenngrößen ermittelt:

- Arithmetischer Mittelwert (MW): beschreibt die durchschnittliche Größe der Einzelwerte
- Standardabweichung (SD): quantifiziert die Variabilität der Einzelwerte
- Spannweite (R = Variationsbreite = Range): ist die Differenz zwischen dem größten und dem kleinsten Messwert

Auch wurde, um die Art und Intensität eines linearen Zusammenhanges zwischen zwei Ausprägungen verschiedener Merkmale zu quantifizieren, der Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient nach Pearson (r) berechnet. Dabei gilt:  $-1 < r < 1$ . Eine negative Korrelation bedeutet, dass eine Erhöhung der Werte eines Merkmales mit der Abnahme der Werte des anderen Merkmales einhergeht. Im Falle einer positiven Korrelation verhalten sich beide Merkmale synchron (d. h. Zu- oder Abnahme der Werte beider Merkmale). Der Korrelationskoeffizient ermöglicht eine Aussage darüber, wie eng der lineare statistische Zusammenhang zwischen zwei Größen ist. Je straffer die Beziehung ist, umso näher liegt der Wert bei  $\pm 1$ . Ein Wert bei 0 lässt auf das Fehlen einer linearen Beziehung schließen. Dabei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von  $< 0,05$  ( $< 5\%$ ) zugrunde gelegt. Bei einer Beurteilung des Korrelationskoeffizienten mit Hilfe eines p-Wertes müssen die Vorzeichen des Korrelationskoeffizienten mit Vorsicht interpretiert werden. Wenn die Nullhypothese „ $p = 0$ “ nicht abgelehnt werden kann, liegt der empirische Korrelationskoeffizient nahe bei Null, d. h. dieser kann sowohl positiv als auch negativ sein.



Im Vergleich der Jahresänderungen (Änderung zwischen Sommer 2003 und Sommer 2004) der Spannweiten zwischen Sommer 2003 und Sommer 2004 der unterschiedlichen Untersuchungsparameter wurde als statistischer Test der U-Test nach Mann-Whitney angewandt. Hierbei handelt es sich um einen nichtparametrischen Test zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben quantitativer Merkmale. Dabei wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p$ )  $< 0,05$  ( $< 5\%$ ) zugrunde gelegt. Die Ergebnisse des U-Tests müssen im Sinne einer explorativen Statistik verstanden werden und sind nicht ohne weiteres zu verallgemeinern. Zur grafischen Darstellung dienen Boxplots.

Der Boxplot ist eine grafische Darstellung zur Charakterisierung der Verteilung stetiger Merkmale, beruhend auf den so genannten empirischen Quartilen und stellt schematisch eine Häufigkeitsverteilung dar. Unter Quartilen ist das 25., 50. und 75. Perzentil zu verstehen, wobei Perzentile Auskunft über die Lage und Streuung von Variablen geben. Dabei entspricht der Median dem 50. Perzentil (2. Quartil, 50 % Quartil). Der Interquartilsabstand wird als Kasten dargestellt, in den 50% aller Beobachtungen fallen und der vom ersten und dritten Quartil (25. bzw. 75. Perzentil) begrenzt wird. Von diesem aus werden Linien bis zum Minimum (kleinster Stichprobenwert) bzw. Maximum (größter Stichprobenwert) gezogen, sofern diese keine Ausreißer sind. Ein Ausreißer ist in der Datenreihe eines Merkmals ein extrem großer oder extrem kleiner Wert, der nicht zu der gleichen Grundgesamtheit gehört wie die übrigen Elemente der untersuchten Stichprobe. Werte, die um mehr als drei Kastenlängen außerhalb liegen (Extremwerte), werden im Boxplot mit einem Stern markiert. Werte, die um mehr als anderthalb Kastenlängen außerhalb liegen, werden mit einem Kreis gekennzeichnet (BÜHL und ZÖFEL, 2005). Im Kasten wird der Median durch eine Linie gekennzeichnet, wobei jeweils die Hälfte aller Beobachtungen größer/gleich und die andere Hälfte kleiner/gleich dem Median sind. Ist der Median nicht in der Mitte des Kastens angeordnet, liegt eine schiefe Verteilung vor. Bei der Darstellung des Medians fallen, im Gegensatz zum arithmetischen Mittelwert Ausreißer und Extremwerte geringer ins Gewicht. Bei dieser grafischen Darstellung sind 25 % aller Beobachtungen größer/gleich dem 3. Quartil und 25 % aller Beobachtungen kleiner/gleich dem 1. Quartil.