

4 Pferdekontingent und Methodik

4.1 Pferdekontingent und Untersuchungsplan bzw. -zeitraum

Die Untersuchungen wurden an 29 Vollblutjährlingen im Alter zwischen 15 und 22 Monaten durchgeführt. Die Tiere stammten alle aus demselben Gestüt und wurden unter gleichen Fütterungs- und Haltungsbedingungen gehalten.

Bis auf eine Ausnahme (Pferd Nr. 13) wurde jedes Tier über einen Zeitraum von neun Wochen untersucht.

Zunächst waren die Pferde im Aufzuchtstall untergebracht und wurden während des dortigen Aufenthaltes auch angeritten. Je nach körperlicher Verfassung und Trainingszustand wurden die Jährlinge über durchschnittlich 14 Tage täglich 25 Minuten geritten, hiervon fünf bis zehn Minuten im Trab und fünf bis zehn Minuten im Galopp.

Anschließend wurden sie zur Rennbahn verbracht, um dort mit dem eigentlichen Training zu beginnen. Die Pferde mussten täglich (außer montags) dreimal über ein Drittel der 1900m langen Sandbahn galoppieren, wobei zwischen den drei Galoppetappen eine zweiminütige Schrittpause eingelegt wurde. Einschließlich des Wegs von und zur Sandbahn dauerte das tägliche Training etwa 25 Minuten.

4.2 Methoden zur Bestimmung der Parameter des Knochenstoffwechsels

4.2.1 Entnahme und Vorbereitung der Blutproben

Um einen Einfluss circadianer Schwankungen der einzelnen Parameter zu vermeiden, wurden alle Blutproben zur gleichen Uhrzeit, morgens zwischen 6.30 und 7.30 Uhr, entnommen.

Von jedem Pferd wurden vor dem Verbringen auf die Rennbahn Blutproben in wöchentlichem Abstand entnommen. Nach dem Wechsel auf die Rennbahn wurden weitere Proben im Zwei-Wochen-Rhythmus gezogen..

Für die Blutentnahme aus der Vena jugularis wurde das Venoject-System (Fa. Terumo, Leuven/Belgien) verwendet. Es besteht aus

- a. einer Terumo-Kanüle 1,2 mm (rosa Farbcode),
- b. einem silikonisierten Vakuumbloodentnahmeröhrchen (10 ml Volumen),
- c. einem Halter für Vakuumbloodentnahmeröhrchen.

Die Blutproben wurden unmittelbar nach ihrer Gewinnung auf 2°C heruntergekühlt und in einer gekühlten Zentrifuge 5 min bei 8 000 U/min zentrifugiert. Das so gewonnene Serum wurde abpipettiert, in Eppendorfröhrchen (2 ml) gefüllt und bei -18°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

4.2.2 Parameter des Knochenaufbaus

4.2.2.1 Osteocalcin

Osteocalcin wird mit Hilfe des kompetitiven Immunoassays NovoCalcin (Fa. Metra Biosystems, Mountain View/Kalifornien/USA) bestimmt.

Materialien:

- Mikrotiterplatten
beschichtet mit Osteocalcin aus menschlichem Knochen
- Standards (0, 2, 4, 8, 16, 32 ng/ml)
Lyophilisiertes Osteocalcin mit Pufferlösung und Konservierungsmittel
- Hoch-/Niedrig-Kontrollen
Lyophilisiertes Osteocalcin mit Pufferlösung und Konservierungsmittel
- Anti-Osteocalcin
Aufgereinigter, monoklonaler Mäuse-Anti-Osteocalcin-Antikörper in einer gepufferten Lösung mit nicht-ionischem Detergens, Stabilisatoren und Konservierungsmittel
- Enzym-Konjugat
Lyophilisiertes Ziegen-Anti-Maus-IgG-Antikörper konjugiert an alkalische Phosphatase mit Pufferlösung und Konservierungsmittel
- Waschlösung
Nicht-ionisches Detergens in gepufferter Lösung mit Konservierungsmittel (Vor Gebrauch 1 : 10 mit deionisiertem Wasser verdünnen).
- Substratpuffer
Diäthanolamin und Magnesiumchlorid mit Konservierungsmittel
- Substratabletten
p-Nitrophenylphosphat 20 mg
- Stopp-Lösung
1 N Natronlauge

Durchführung:

1. In jedes Well werden 25 µl Standard, Kontrolle oder Pferdeserum pipettiert.
2. 120 µl Anti-Osteocalcin-Antikörper werden zugefügt.

3. Zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur.
4. Dreimaliges Waschen mit Waschlösung.
5. Es werden in jedes Well 150 µl Enzym-Konjugat pipettiert.
6. 60 min Inkubation bei Raumtemperatur.
7. Dreimaliges Waschen mit Waschlösung.
8. Zufügen von 150 µl Lösung aus Substratpuffer und Substratlösung.
9. 35-40 min Inkubation bei Raumtemperatur.
10. Zufügen von 50 µl Stopp-Lösung.
11. Ablesen der optischen Dichte bei 405 nm.

Qualitätskontrolle:

Zur Qualitätskontrolle wurde vor jedem Messdurchgang dreimal kontrolliert, ob die bekannte optische Dichte der mitgelieferten Standardlösungen angezeigt wurde.

4.2.2.2 Knochenspezifische alkalische Phosphatase

Die knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP) wurde mit dem Immunoassay Alkphase-B (Fa. Metra Biosystems, Mountain View/Kalifornien/USA) bestimmt.

Materialien:

- Mikrotiterplatten beschichtet mit aufgereinigtem, monoklonalen Mäuse-Anti-BAP-IgG-Antikörper
- Hoch-/Niedrig-Kontrollen
BAP aus Osteosarkomzellen in gepufferter Lösung mit Magnesiumchlorid, Zinksulfat, Surfactant, Carrier-Protein, Blue Dye und Konservierungsmittel

- BAP-Standards (0, 2, 20, 50, 80, 140 BAP U/l
BAP aus Osteosarkomzellen in einer gepufferten Lösung mit Magnesiumchlorid, Zinksulfat, Surfactant, Carrier-Protein, Blue Dye und Konservierungsmittel
- Waschlösung
Nichtionisches Detergens in einer gepufferten Lösung mit Konservierungsmittel (Vor Gebrauch 1 : 10 mit deionisiertem Wasser verdünnen).
- Pufferlösung
Gepufferte Lösung aus Magnesiumchlorid, Zinksulfat, Surfactant und Konservierungsmittel
- Substratpuffer
Eine 2-Amino-2-Methyl-1-Propanolol-Lösung mit EDTA, Magnesiumchlorid, Zinksulfat und Konservierungsmittel
- Substratabletten
p-Nitrophenylphosphat 20 mg
- Stopp-Lösung
1 N Natronlauge

Durchführung:

1. In jedes Well werden 125 µl Pufferlösung pipettiert.
2. Hinzu kommen jeweils 20 µl Standard, Kontrolle oder Pferdeserum. Vorsichtiges Durchmischen durch Schwenken der Platte.
3. Inkubation 3 h bei Raumtemperatur.
4. Eine Substratablette wird in einem Fläschchen Substratlösung gelöst. Der Lösungsvorgang dauert 30-60 min, anschließend wird die Lösung durch Schütteln vollständig vermischt.
5. Die Wells werden manuell entleert und viermal mit Waschlösung gewaschen.
6. Nach Zufügen von 150 µl der vorbereiteten Substratlösung (s. Punkt 4) wird 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.
7. 100 µl Stopp-Lösung werden in jedes Well pipettiert.

8. Die optische Dichte wird innerhalb von 15 min nach der Stopp-Reaktion bei 405 nm abgelesen.

Qualitätskontrolle:

Vor jedem Messdurchgang wird dreimal mit Hilfe der im Testkit enthaltenen Standardlösungen bekannter Konzentration kontrolliert, ob diese Konzentration nachweisbar war.

4.2.3 Querverbundene carboxyterminale Telopeptide des Typ 1-Kollagen (ICTP) als Parameter des Knochenabbaus

Zur Bestimmung der querverbundenen carboxyterminalen Telopeptide des Typ 1-Kollagen (ICTP) wurde der Serum CrossLaps One Step ELISA (Fa. Osteometer Bio-Tech, Herlev/Dänemark) eingesetzt.

Materialien:

- Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten (12 x 8 Wells)
- 6 CrossLaps Standards 3,0 ml (PBS-gepuffert mit Protein-Stabilisator und Konservierungsmittel)
- Kontrolle 0,5 ml (entsalztes Harn-Antigen menschlichen Ursprungs in PBS-gepuffert Lösung mit Protein-Stabilisator und Konservierungsmittel)
- Biotinylierter Antikörper 0,25 ml in PBS-gepuffert Lösung mit Protein-Stabilisator und Konservierungsmittel (Fläschchen 1)
- Peroxidase-konjugierter Antikörper 0,25 ml in PBS-gepuffert Lösung mit Protein-Stabilisator und Konservierungsmittel (Fläschchen 2)
- Inkubations-Puffer 20,0 ml mit Protein-Stabilisator, Detergens und Konservierungsmittel (Fläschchen 3)

- Substratlösung 15,0 ml, Tetramethylbenzidin in saurer Lösung
- Stopp-Lösung 15,0 ml, 0,18 M Schwefelsäure
- Waschlösung 40,0 ml aus Detergens und Konservierungsmittel (Vor Gebrauch 1:50 mit destilliertem Wasser verdünnen).
- Verschuß-Klebestreifen für die Abdichtung der Wells während der Inkubierung

Durchführung:

1. Präparation der Antikörper-Lösung.
Der Inhalt der Fläschchen 1-3 wird 30 min vor Testbeginn im Verhältnis 1 : 1 : 100 gemischt.
2. One Step-Inkubation.
Jeweils 50 µl der Standards, der Kontrolle und der einzelnen Pferdeseren werden in ein Well pipettiert. Es folgen je 150 µl Antikörper-Lösung. Nach Verschuß der Mikrotiterplatte mit Klebestreifen wird für 120 min bei Raumtemperatur auf einem Mikrotitermischer (300 U/min) inkubiert.
3. Waschen.
Die Platten werden fünfmal mit Waschlösung gewaschen.
4. Inkubation mit Substratlösung.
In jedes Well werden 100 µl Substratlösung pipettiert und nach Verschuß die Mikrotiterplatte auf dem Mischer 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.
5. Stopp-Reaktion.
In jedes Well werden 100 µl Stopp-Lösung pipettiert.
6. Messung der Absorption.
Innerhalb von zwei Stunden nach Stoppen der Reaktion wird die Absorption bei 650 nm gemessen.

Auswertung:

Die Bestimmung der Telopeptide in den Pferdeseren erfolgte im Doppelansatz. Der Mittelwert beider Messungen wird gegen eine Standardkurve (erstellt aus den 6 Standards) aufgetragen.

Qualitätskontrolle:

Zur Qualitätskontrolle wurde vor jedem Messdurchgang dreimal geprüft, ob die bekannte Konzentration der mitgelieferten Standards nachgewiesen werden konnte.

4.2.4 1, 25-Dihydroxycholecalciferol

Die Bestimmungen des 1,25-Dihydroxycholecalciferol wurden freundlicherweise durch das Institut für Ernährungswissenschaften der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. rer. nat. P. Stehle) mit Hilfe eines dort entwickelten RIA durchgeführt.

4.3 Röntgenuntersuchung

Da ein Röntgengerät erst nach Beginn der Blutprobenentnahmen zur Verfügung gestellt wurde, konnten Röntgenaufnahmen lediglich von den Pferden 15 bis 30 angefertigt werden.

Bei diesen Pferden wurde jeweils unmittelbar vor Aufnahme des Trainings und am Ende des Beobachtungszeitraums je eine anterior-posteriore Röntgenaufnahme des linken Metacarpus III mit dem Vet Ray Gamma (Fa. Physia, Neu-Isenburg) angefertigt.

Die Röntgenbilder wurden mit einem Densitometer (ACI Duo-Light, Fa. Scanditronix, Schwarzenbruck) ausgewertet. Hierbei wurde die optische Dichte jeweils an vier Stellen im Bereich der Kortikalis und an vier Stellen im Bereich der Spongiosa gemessen. Die Ermittlung der Dichte erfolgt durch den Vergleich mit einer definierten Stufenskala, die die Dichte eines Aluminiumobjekts (RMI Aluminium Stepwedge Model 117, Ga. Gammex-RMI, Bad Münstereifel) mit bekannter optischer Dichte wiedergibt. Daher wird die optische Dichte mit der Einheit RBAE (radiographic bone aluminium equivalent) in mm Al bezeichnet (MEAKIM et al., 1981).

Zur Einübung in die Technik und zur Qualitätskontrolle wurden Röntgenaufnahmen von equinen Metacarpi angefertigt, die vom Institut für Veterinär-Pathologie der Landwirtschaftlichen Fakultät, Universität Bonn, zur Verfügung gestellt wurden.

4.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde nach Beratung durch Herrn Professor Helmut Küchenhoff und Frau Katharina Lensing im Statistischen Beratungslabor der Universität München mit dem Programmpaket SPSS Version 10.1 für Windows durchgeführt.

Zur Prüfung, ob postulierte Unterschiede beziehungsweise Zusammenhänge zwischen den untersuchten Parametern existieren, wurden folgende statistische Tests durchgeführt.

- t-Test für gepaarte Stichproben
- Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient
- Pearson'scher Korrelationskoeffizient

Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit den Programmpaketen Deltagraph 3,0 und Excel 8,0. Das Berechnen und Einzeichnen von Trendlinien wurde von den Programmen automatisch durchgeführt.