

3. MATERIAL UND METHODE

Die Versuche wurden im Zeitraum zwischen Dezember 1998 und Februar 1999 im „Trainings- und Rehabilitationszentrum für Sportpferde“ in Reichertsheim, Bayern durchgeführt.

3.1. Tiergruppe

Es standen sieben Pferde unterschiedlichen Alters und Geschlechts, mit unterschiedlichem Trainingsstand und Verwendungszweck zur Verfügung (Tabelle 1). Da alle sieben Pferde auf dem Gelände eingestellt waren, waren Haltungs- und Fütterungsbedingungen annähernd gleich.

Name	Geburtsdatum	Rasse	Verwendungszweck	Trainingsstand bzw. Trainingsphase 98/99
Pf. 1	1993	Hannoveraner Hengst	Reitpferd	Übergangsphase
Pf. 2	1984	Hannoveraner Stute	Reitpferd	Aktive Ruhephase
Pf. 3	1989	Hannoveraner Stute	Reitpferd	Aktive Ruhephase / Übergangsphase
Pf. 4	1986	Bayer Wallach	Vielseitigkeitspferd	Übergangsphase / Vorbereitungsphase
Pf. 5	1995	Bayer Wallach	Reitpferd (angeritten)	Aktive Ruhephase / Übergangsphase
Pf. 6	1986	Hannoveraner Stute	Vielseitigkeitspferd (international)	Übergangsphase / Vorbereitungsphase
Pf. 7	1990	Holsteiner Wallach	Spring-/ Vielseitigkeitspferd	Übergangsphase / Vorbereitungsphase

Tabelle 1: Angaben über Alter, Rasse, Verwendungszweck und Trainingsstand der in die Untersuchung einbezogenen Pferde.

Aktive Ruhephase:

- leichte Bewegung und Weidegang

Übergangsphase:

- $\frac{1}{2}$ - $\frac{3}{4}$ h pro Tag Reiten oder Longenarbeit und Weidegang

Vorbereitungsphase:

- 1 h Reiten, Gymnastik, Springen, Ausdauertraining im Gelände, Weidegang

3.2. Versuchsablauf

Für die Ruhewerte und die Belastungstests wurden die Umgebungsbedingungen so weit wie möglich standardisiert. Alle Pferde wurden vor Versuchsbeginn mehrtägig mit der Arbeit im Aquatrainer vertraut gemacht. Es wurde versucht störende Einflüsse von außen auf ein Minimum zu reduzieren. Eine individuelle Aufregung, besonders während der ersten Versuchsstufen, war aber nicht immer zu vermeiden.

Die Versuchsvorbereitungen, die Belastungstests und die Beruhigungsphasen fanden immer in demselben geschlossenen Raum statt, in dem sich auch der Aquatrainer befand. Hilfeleistungen wurden von vertrautem Betreuungspersonal ausgeführt. Es kamen nur klinisch gesunde Tiere zum Einsatz. Aufgrund des relativ langen Testzeitraumes (November bis Februar) waren Schwankungen der Außentemperatur nicht zu vermeiden. Am Tag vor einem Versuch hatten die Pferde einen Ruhetag, wurden leicht bewegt oder hatten Auslauf auf der Weide. Jedes Pferd mußte neben einer Untersuchung in Ruhe insgesamt sechs einzelne Belastungsversuche absolvieren, wobei zwischen den jeweiligen Versuchen ein bis zwei Tage lagen.

Die Einteilung der Belastungsstufen erfolgte anhand der unterschiedlichen Gangart (Schritt oder Trab) und der Wasserhöhen:

RR: Ruhewerte

ST: Schritt auf trockenem Laufband

SK: Schritt bei Wasserhöhe Karpalgelenk

SE: Schritt bei Wasserhöhe Ellenbogen

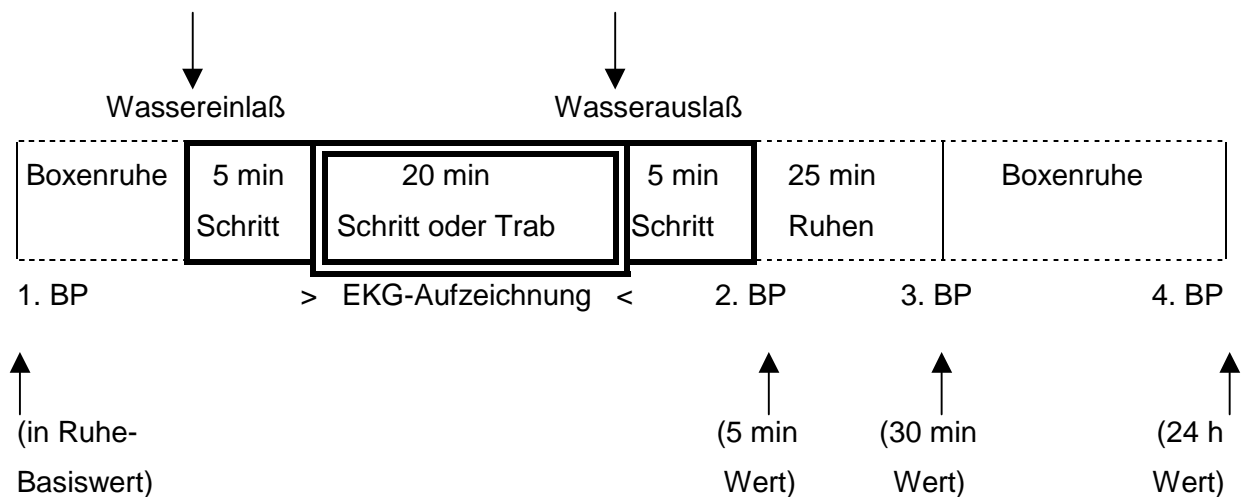
TT: Trab auf trockenem Laufband

TK: Trab bei Wasserhöhe Karpalgelenk

TE: Trab bei Wasserhöhe Ellenbogen

Die Laufbandgeschwindigkeiten betragen im Schritt durchschnittlich 94 ± 5 m/min bzw. im Trab durchschnittlich 174 ± 8 m/min.

Versuchsablauf:



BP= Blutprobe

Blutparameter

Ruhewerte:

An jedem Morgen vor einem der sechs Belastungstests wurde dem jeweiligen Probanden ca. 1½ h nach der Fütterung Blut (1. BP= Ruhewert) entnommen. Die Blutentnahmen aus der Vena jugularis erfolgten ohne Aufregung immer von derselben Person mit evakuierten Zentrifugenröhrchen der Marke „Venoject“ (Firma Terumo). Es wurden jeweils ein EDTA-beschichtetes (K3E) (4 ml), ein heparinisirtes (10 ml) und ein silikon-beschichtetes (10 ml) Zentrifugenröhrchen verwendet.

Belastungswerte:

Circa 1h nach der Blutentnahme in Ruhe wurden die Pferde für den Versuch in den Trainingsraum geführt. Dort wurde ihnen das transportable EKG-Gerät angelegt und eine kurze Funktionsprobe durchgeführt. Nach dem Hineinführen in den Aquatrainer und Schließen der Türen, wurde das Laufband angestellt. Bei den Versuchen im Wasser wurde zudem die Wasserpumpe gleichzeitig mit eingeschaltet.

Nach einer 5minütigen Warmlaufzeit im Schritt, die auch zum Erreichen der festgesetzten Wasserhöhe diente, folgte der eigentliche zwanzig Minuten dauernde Belastungsversuch, variiert durch die jeweilige Gangart und die Wasserhöhe. Nach zwanzig Minuten wurde das Laufband gegebenenfalls wieder auf Schrittgeschwindigkeit eingestellt und das Wasser aus dem Aquatrainer heraus gepumpt. Diese Phase war nach 5 Minuten beendet. Am Ende dieser Zeitspanne wurde dann das Laufband angehalten und sofort, noch im Aquatrainer, der erste Belastungswert (2. BP: 5-Minuten-Wert) genommen. Es folgte eine 25minütige Ruhezeit unter dem Solarium, in der die Beine der Pferde mit Wasser gereinigt und getrocknet wurden. Dann folgte die dritte Blutentnahme (3. BP: 30-Minuten-Wert). Zur Bestimmung des Abklingverhaltens der Enzyme wurde am folgenden Tag, 24h nach Ende der Belastungsphase, ein vierter Blutwert (4. BP) genommen (10ml Serumröhrchen). Bis zu diesem Zeitpunkt hatten die Pferde Boxenruhe.

Herzfrequenzvariabilität

Ruhewert:

Zur Ermittlung der Ruheherzfrequenz wurde von jedem Pferd zwei bis drei Tage vor Beginn der Belastungstestreihe einmalig ein Ruhe-EKG mit dem transportablen EKG-Gerät aufgezeichnet.

Belastungswerte:

Das EKG wurde während des gesamten Versuchszeitraumes im Aquatrainer (insgesamt 30 Minuten) und während der Ruhephase unter dem Solarium (25 Minuten) aufgezeichnet. Jedoch nur die 20minütige eigentliche Belastungsphase wurde zur Analyse der HRV unter Belastung herangezogen.

3.3. Diagnostik

Blutparameter

Direkt im Anschluß an die Blutentnahme wurden aus dem heparinisierten Blut die Laktatkonzentration und der pH-Wert ermittelt. Die Bestimmung des **Laktatgehaltes** wurde mit Hilfe des "Miniphotometers 8 plus" der Firma Dr. Lange durchgeführt. Die Messung des Dr. Lange Küvetten-Tests LKM140 beruht auf der LOX-PAP-Methode bei der Laktat zunächst mit Sauerstoff durch die Laktatoxidase zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid umgewandelt wird. Das entstandene Wasserstoffperoxid reagiert dann mit 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol unter Einwirkung der POD (Peroxidase). Die Konzentration des hierbei gebildeten roten Farbstoffes wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 520 nm bestimmt.

Die Analyse des **pH-Wertes** erfolgte mittels einer Glaselektroden-Meßkette, durchgeführt mit dem "IONIZED CALCIUM ANALYSER" (ICA 2) der Firma Radiometer Copenhagen.

Die Messungen beider Parameter wurden stets als Doppelbestimmungen durchgeführt und der gebildete Mittelwert als Ergebnis dokumentiert.

Zur Bestimmung der übrigen Blutparameter (**Hämoglobingehalt** (Hb), **Hämotokrit** (Hkt), **Erythrozytenzahl** (RBC), **Gesamteiweiß** (GE), **Creatin-Kinase** (CK), **Aspartat-Aminotransferase** (AST), **Laktat-Dehydrogenase** (LDH), **Alanin-Aminotransferase** (ALT)) wurde das Blut in den silikon-beschichteten Röhrchen zentrifugiert, das überstehende Plasma abpipettiert und gekühlt. Dieses Plasma und das gekühlte Vollblut in den EDTA-Röhrchen wurden an das Labor Med-Pharm in Augsburg versandt. Die dort zur weiteren Bearbeitung verwendeten Analyseverfahren sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Parameter	Herstellerbezeichnung	Methode
Laktat	Dr. Lange; „Dr Lange Küvetten-Test LKM140“	LOX-PAP- Methode
pH	Radiometer; „ICA 2“	Glaselektroden-Meßkette
RBC	Abbott; „Celdyn 3500“	Widerstandsmessung
Hkt	Abbott; „Celdyn 3500“	Widerstandsmessung
Hb	Abbott; „Celdyn 3500“	Modifiz. Hämoglobincyanidmethode (Extinktionsmessung bei 540 nm)
GE	Olympus Typ AU 600	Biuret-Methode; Photometrischer Farbstest
CK	Olympus Typ AU 600	Standard. kinetischer UV Test
AST	Olympus Typ AU 600	Standard. kinetischer UV Test
LDH	Olympus Typ AU 600	Standard. kinetischer UV Test
ALT	Olympus Typ AU 600	Standard. kinetischer UV Test

Tabelle 2: Gerätebezeichnungen und Analyseverfahren der gemessenen Blutparameter.

Herzfrequenzvariabilität

Für die Aufzeichnung des EKGs (Elektrokardiogramms) zur Erfassung der Herzfrequenz und der Herzfrequenzvariabilität (HRV) wurde das PAR-PORT/M-Langzeit-Biosignalerfassungs-Meßsystem (PAR-PORT/M) der Firma PAR Elektronik GmbH, Berlin verwendet. Hierfür wurde den Pferden ein mit drei Plattenelektroden ausgestatteter elastischer Bauchgurt in der Sattellage kurz hinter den Ellenbogen

angelegt. Die Position der Elektroden war wie folgt: während sich die erste Elektrode links auf Höhe des Herzspitzenstoßes befand, lag die zweite dem linken dorsalen Quadranten auf. Die Erdungselektrode hatte Kontakt zum rechten dorsalen Quadranten. Um eine möglichst gute Leitfähigkeit zu erzielen wurde eine Kontaktpaste (Elektroden Creme; Hellige®) zwischen Elektrode und Körperoberfläche aufgetragen. Mit Hilfe dieses Meßsystems und des PARON Computerprogrammes (PAR Elektronik GmbH, Berlin) war es dann möglich die bei der Herzaktion auftretenden elektrischen Potentiale von der Körperoberfläche abzuleiten und graphisch in ihrem zeitlichen Verlauf aufzuzeichnen. Die so gewonnenen EKG-Daten wurden online gespeichert und nach dem Versuch zur Aufbereitung in einen stationären Personalcomputer übertragen. Die durch das Programm PARON bereitgestellten IBI- und EKG-Daten (ASCII-Format) wurden mit Hilfe des Programms PARIBIS (PARIBIS® by Mohr) zunächst in ein schneller zu verarbeitendes, programminternes Datenformat (Real-Werte) übersetzt. Für eine weitere Auswertung der Daten mußten dann zunächst Artefakte und Störsequenzen in der Herzfrequenzaufzeichnung manuell korrigiert werden, wobei der EKG-File zur Korrektur der IBI-Datenreihe diene.

Aus dem nun für das MULTIDAT-Programm (MULTIDAT V.4® by Mohr 1987-1997) lesbaren Datenformat wurden für die Berechnung der HRV-Parameter, mit Ausnahme der SDNN und des HRV tr Index, die sich auf die gesamte Meßdauer beziehen, 5-Minuten-Zeitfenster (300 s) über die Meßreihe projiziert. Durch einen Versatz dieses Fensters in 30 Sekunden Abständen war es dann möglich eine gleitende Analyse der Daten durchzuführen. Für die zwanzig Minuten dauernden Belastungen bedeutet dies, daß anhand der IBIs aus 29 5-Minuten-Zeitfenstern das mittlere Verhalten der Zeitbereichsparameter (mittlere SDANN; mittlere RMSSD) bestimmt werden konnte.

Zur Bestimmung der Frequenzbereichsparameter war es notwendig, daß die Daten in äquidistanten, d.h. exakt gleichen, Zeitabständen vorlagen. Dies wurde mit Hilfe einer Interpolation erreicht, bei der für jede Sekunde des 5-Minuten-Zeitraums ein Herzfrequenzwert berechnet wurde, also die momentane Herzfrequenz. Danach erfolgte eine FFT (fast fourier transformation) der Zeitreihe, wodurch der Kurvenverlauf in die harmonischen Schwingungen (Sinusschwingungen) seiner unterschiedlichen Frequenzanteile (Malik, 1996) zerlegt werden kann.

Die Berechnung der recurrence plot Parameter wurde gemäß den Vorgaben der „recurrence quantification analysis, v 5.2.“ (RQA) nach Webber und Zbilut (1994) aus denselben 5-Minuten-Fenstern wie die der Zeitbereichsparameter vorgenommen. Hierbei wurde ein 10-dimensionaler Raum zugrunde gelegt. Dies entspricht der Annahme, daß mindestens 10 verschiedene Faktoren bei der Entstehung der Herzfrequenz wirksam sind.

Für die HRV Messung wurden die in Tabelle 3 aufgelisteten Parameter berechnet.

3.4. Statistik

Die statistischen Berechnungen und die graphischen Darstellungen wurden mit Hilfe der Computerprogramme SigmaStat[®] bzw. SigmaPlot[®] (Jandel Scientific Corp., Calif.) vorgenommen.

Es wurden zwei unterschiedliche Vergleiche durchgeführt:

1. Belastungsstufenvergleich:

Die Prüfung signifikanter Unterschiede zwischen dem Ruhewert (RR) und den sechs verschiedenen Belastungsstufen (5-Minuten-Werte von ST bis TE) erfolgte anhand einer nicht parametrischen „ANOVA on Ranks“ (Median \pm MAD; (Sachs, 1984)) und bei Vorliegen signifikanter Unterschiede und gleich großer Gruppenzahlen mit dem nachgeschalteten Test „Student-Newmann-Keuls Method“ und bei unterschiedlich großer Gruppenzahl mit der „Dunn’s Method“. Bei allen Tests wurde ein Signifikanzniveau von $P < 0.01$ festgelegt.

Alle Graphiken zeigen die Ergebnisse in Ruhe (RR) und für die sechs verschiedenen Belastungsstufen (5-Minuten-Werte von ST bis TE). Es werden sowohl die Einzelverläufe (für Blutwerte: Einzelwerte; für HRV: Mediane) der sieben Pferde, als auch die daraus berechneten Mediane \pm MAD als Box-Plots dargestellt.

2. Abklingverhalten:

Die Prüfung signifikanter Unterschiede durch Vergleich der drei bzw. vier genommenen Blutproben zur Analyse des Abklingverhaltens der Blutparameter

erfolgte mit einer parametrischen „One Way ANOVA“ (Mittelwert \pm SD). Aufgrund der hier gleich großen Gruppengrößen konnte als nachgeschalteter Test die „Student-Newmann-Keuls Method“ verwendet werden. Zu einer genauen Überprüfung signifikanter Unterschiede wurde zusätzlich der parametrische „paired t-test“ verwendet. Auch hier wurden die Signifikanzen mit $P < 0.01$ berechnet.

Die Ergebnisse der Analyse des Abklingverhaltens werden in Form von Mittelwerten \pm SD in Tabellen aufgelistet. Als Graphik werden der Ruhewert, der 5-Minuten-Wert und der 30-Minuten-Wert des Hämoglobins aller sechs Belastungstests (ST bis TE) für die einzelnen Pferde als Einzelverläufe und die daraus berechneten Mittelwerte \pm SD als Box-Plots exemplarisch dargestellt.

linear parameters (Lineare Parameter)

- time domain measures (Zeitbereichsparameter)

- HR [bpm]: heart rate
- IBI [ms]: inter-beat-interval
- SDNN [ms]: standard deviation of all normal (NN) intervals
- RMSSD [ms] root mean square of the sum of the squares of differences between adjacent NN intervals
- SDANN [ms] standard deviation of the averages of NN intervals in all 5-minute segments
- HRV Triangular Index: total number of all NN intervals divided by the height of the histogram of all NN intervals

- frequency domain measures (Frequenzbereichsparameter)

- Integral VLF (very low frequency) [ms^2]: power in VLF range 0.0033-0.04 Hz
- Integral LF (low frequency) [ms^2]: power in LF range >0.04 -0.116 Hz *
- Integral HF (high frequency) [ms^2]: power in HF range >0.116 -0.4 Hz *
- Integral TP (total power) [ms^2]: variance of all NN intervals
- LF_{NORM} [%]: $\text{LF} \times 100 / (\text{LF} + \text{HF})$
- HF_{NORM} [%]: $\text{HF} \times 100 / (\text{LF} + \text{HF})$
- LF/HF ratio: $\text{LF}_{\text{NORM}} / \text{HF}_{\text{NORM}}$

(Malik, 1996); * Anpassung der Grenzen an die Verhältnisse beim Pferd

non-linear parameters (Nichtlineare Parameter)

- recurrence plot measures (recurrence plot Parameter)

- %recurrence [%]: percentage of the plot occupied by recurrent points
- %determinism [%]: percentage of recurrent points that form upward diagonal line segments
- ratio_{KORR} (%determinism / %recurrence):
addresses nonstationarity characteristics in recurrence plots
- entropy_{KORR} [bits]: complexity of a system (of recurrence plots)

(Webber and Zbilut, 1994)

Tabelle 3: Gemessene und berechnete Parameter zur Analyse der HRV.

Aufgrund der Tatsache, daß zum heutigen Zeitpunkt noch wenig über den VLF-Parameter und die diesen Wert beeinflussenden Größen bekannt ist, ist eine Bewertung der Ergebnisse für diesen Parameter schwierig. Vielleicht auch infolge der relativ geringen Probandenzahl, läßt sich keine verwertbare physiologische Bedeutung ableiten. Aus diesen Gründen erfolgt keine weitere Ausführung dieses Parameters.

Es wird auch von einer näheren Erläuterung der Integral LF und Integral HF abgesehen, da sich diese im Vergleich zur LF_{NORM} und HF_{NORM} als nicht besonders aussagekräftig in der Untersuchung erwiesen haben.