

**Aus der  
Klinik für Pferde, Allgemeine Chirurgie und Radiologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin der  
Freien Universität Berlin**

**Veränderungen der  
Myeloperoxidaseaktivität nach Trainingsbelastung im Serum von Trabern**

**Inaugural Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von**  
Katrin Haberkamp  
**Tierärztin**  
aus Düsseldorf

**Berlin 2013**

Journal-Nr.: 3639

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: PD. Dr. Bianca Carstanjen, PhD  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Kerstin E. Müller

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

Horses, exercise, peroxidase, malondialdehyde, carbonyl compounds, oxidative stress, serum

Tag der Promotion: 19.02.2014

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-447-6

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2014

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

Meiner Großmutter



## INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	7
2	Literatur .....	8
2.1	Leistungsphysiologie und –pathologie beim Pferd .....	8
2.1.1	Einfluss von Belastung auf Laktat, Herzfrequenz und Muskelenzyme .....	8
2.1.2	Einfluss von Belastung auf das leukozytäre Blutbild.....	11
2.2	Die Myeloperoxidase .....	13
2.2.1	Synthese und enzymatische Aktivität.....	13
2.2.2	Extramikrobizide Wirkungen .....	16
2.2.3	Physische Belastung.....	17
2.2.4	Beteiligung am oxidativen Stress .....	20
2.3	Reaktive Sauerstoffmoleküle unter physischer Belastung .....	22
2.3.1	Entstehung von reaktiven Molekülen unter Belastung .....	22
2.3.2	Schäden durch freie Radikale .....	25
3	Material und Methoden .....	32
3.1	Pferdepopulation und Probenentnahmeplan .....	32
3.2	Herzfrequenzaufzeichnung .....	33
3.3	Laktatmessung .....	36
3.4	Serumenzyme und Kreatinin .....	36
3.5	Blutbild.....	37
3.6	Gesamteiweißkonzentration.....	37
3.7	Myeloperoxidase.....	37
3.7.1	Aktivitätsbestimmung .....	37
3.7.2	Peroxidaseaktivität im Serum.....	39
3.8	Malondialdehydkonzentration .....	39
3.9	Konzentration der proteingebundenen Carbonyle .....	41
3.10	Statistische Auswertung.....	42
4	Ergebnisse.....	43
4.1	Belastung und Intensität .....	43

4.1.1	Trainingsdaten und Herzfrequenz .....	43
4.1.2	Laktat.....	44
4.1.3	Serumenzyme.....	45
4.2	Veränderungen ausgewählter hämatologischer Parameter.....	48
4.2.1	Leukozyten .....	48
4.2.2	Neutrophile Granulozyten .....	48
4.2.3	Verhältnis stabkernige/segmentkernige neutrophile Granulozyten .....	50
4.2.4	Hämatokrit und Gesamteiweiß.....	51
4.2.5	Erythrozyten.....	52
4.3	Myeloperoxidase im Serum.....	53
4.3.1	Myeloperoxidase-Aktivität .....	53
4.3.2	Peroxidaseaktivität im Serum.....	54
4.4	Malondialdehyd.....	55
4.5	Proteingebundene Carbonyle .....	57
5	Diskussion.....	58
5.1	Belastungsintensität.....	58
5.1.1	Herzfrequenz .....	58
5.1.2	Laktat.....	59
5.1.3	Serumenzyme.....	59
5.2	Blutbildveränderungen.....	60
5.3	Myeloperoxidase.....	62
5.4	Malondialdehyd.....	64
5.5	Proteingebundene Carbonyle .....	65
6	Zusammenfassung .....	67
7	Summary.....	68
8	Literaturverzeichnis.....	69
9	Anhang .....	89
10	Publikationsverzeichnis.....	101
11	Danksagung .....	102
12	Selbständigkeitserklärung.....	103

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Reaktionsgleichung der Kreatin-Kinase .....	9
Abbildung 2: Reaktionsgleichung der Aspartat-Amino-Transferase.....	10
Abbildung 3: Reaktionsgleichung der Laktat-Dehydrogenase.....	10
Abbildung 4: Dimerstruktur der Myeloperoxidase .....	13
Abbildung 5: Reaktion der Myeloperoxidase mit Wasserstoffperoxid und Chloridanion.....	14
Abbildung 6: Reaktionsgleichung der Myeloperoxidase im Detail. ....	15
Abbildung 7: Reaktion der Hypochlorsäure mit einem Superoxidanion-Radikal.....	21
Abbildung 8: Reaktion der Hypochlorsäure mit einem Nitrit-Anion.....	22
Abbildung 9: Sauerstoff und Bildung von freien Radikalen.....	23
Abbildung 10: Haber-Weiss-Reaktion.....	23
Abbildung 11: Fenton-Reaktion.....	24
Abbildung 12: Initiation der Lipidperoxidation .....	29
Abbildung 13: Entstehung von Malondialdehyd durch Radikalangriff. ....	30
Abbildung 14: Herzfrequenz- und Geschwindigkeitsaufzeichnung eines Trainings mit GPS Sender. ....	34
Abbildung 15: Herzfrequenz- und Geschwindigkeitsaufzeichnung eines Trainings mit GPS Sender (2). ....	35
Abbildung 16: Reaktionsprinzip der Laktatbestimmung mit dem Dr. Lange Photometer.....	36
Abbildung 17: Beispielhafte Myeloperoxidase-Aktivitätsbestimmung im Pferdeserum. ....	38
Abbildung 18: Beispiel der Hemmung reiner Myeloperoxidase .....	39
Abbildung 19: Der Blutlaktatgehalt .....	44
Abbildung 20: Die Laktat-Dehydrogenase im Serum.....	45
Abbildung 21: Die Kreatin-Kinase im Serum .....	46
Abbildung 22: Die Aspartat-Amino-Transferase im Serum .....	47
Abbildung 23: Die Leukozytenkonzentration.....	48
Abbildung 24: Die Konzentration der neutrophilen Granulozyten .....	49
Abbildung 25: Das Verhältnis der stabkernigen/segmentkernigen neutrophilen Granulozyten .....	50
Abbildung 26: Der Hämatokritwert .....	51
Abbildung 27: Der Erythrozytengehalt .....	52
Abbildung 28: Die Myeloperoxidase-Aktivität im Serum.....	53
Abbildung 29: Myeloperoxidase-Aktivität und gesamte Peroxidaseaktivität im Serum.....	54
Abbildung 30: Der Gehalt an Malondialdehyd im Serum.....	55
Abbildung 31: Zusammenhang zwischen Malondialdehyd und Erythrozytenzahlen im Serum .....	56
Abbildung 32: Der Gehalt der proteingebundenen Carbonyle .....	57

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Untersuchungen zu oxidativem Stress unter Belastung beim Pferd .....	26
Tabelle 2: Probenentnahmeplan .....	32
Tabelle 3: Geschlechtsverteilung der 20 Probanden .....	32
Tabelle 4: Altersverteilung [Jahre] der 20 Probanden.....	33
Tabelle 5: Körpermaße der 20 Probanden .....	33
Tabelle 6: Eckdaten der Belastungsstatistik zur Trainingsbelastung .....	43
Tabelle 7: Werte der Laktatkonzentration.....	89
Tabelle 8: Werte der Myeloperoxidase-Aktivität.....	90
Tabelle 9: Werte der Serumenzyme .....	91
Tabelle 10: Werte der Aktivität der Peroxidasen im Serum .....	92
Tabelle 11: Werte der Leukozytenzahl und der neutrophilen Granulozyten .....	93
Tabelle 12: Werte der Lymphozyten, Monozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten.....	95
Tabelle 13: Verhältnis neutrophiler Granulozyten zu Lymphozyten .....	96
Tabelle 14: Verhältnis stabkerniger zu segmentkernigen Granulozyten .....	97
Tabelle 15: Werte von Gesamteiweiß und Hämatokrit.....	97
Tabelle 16: Werte von Erythrozyten und Hämoglobin .....	98
Tabelle 17: Werte der Malondialdehyd-Konzentration .....	99
Tabelle 18: Werte der proteingebundenen Carbonyle.....	100
Tabelle 19: Referenzbereiche der Kreatin-Kinase beim Pferd.....	100
Tabelle 20: Referenzbereiche der Aspartat-Amino-Transferase beim Pferd .....	100

## Abkürzungen

Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AST	Aspartat-Amino-Transferase
ATP	Adenosintriphosphat
CK	Kreatin-Kinase
CP <sub>Probe</sub>	Carbonylproteingehalt der Probe
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukelinsäure
DNPH	Dinitrophenylhydrazin
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
et al.	et alii
fMLP	N-Formylmethionyl-Lencyl-Phenylalanin
G	Giga (x 10 <sup>9</sup> )
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GPS	Global Positioning System
GPx	Glutathion-Peroxidase-Aktivität
GSSG/GSH	Verhältnis reduziertes/oxidiertes Gluathion
h	Stunde
HF	Herzfrequenz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HOCL	Hypochlorsäure
kDa	Kilodalton
L	Lymphozyten
LDH	Laktat-Dehydrogenase
max	maximal
MDA	Malondialdehyd
min	Minute
MPO	Myeloperoxidase
N 0	Nach der Trainingsbelastung
n	Anzahl der Probanden
N	Neutrophile Granulozyten
N 24	Vierundzwanzig Stunden nach Ende der Trainingsbelastung
N 4	Vier Stunden nach Ende der Trainingsbelastung
N 48	Achtundvierzig Stunden nach Ende der Trainingsbelastung
NAD <sup>+</sup> /NADH+H	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP <sup>+</sup> /NADPH+H	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NO <sub>2</sub>	Stickstoffdioxid
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit
PMA	Phorbol Myristat Acetat
Q <sub>1</sub>	1.Quartil
Q <sub>3</sub>	3.Quartil
RBB	Rote Blutzellen (Erythrozyten)
RFU	Fluorimetrische Absorptionseinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies

S	Herzschläge
SOD	Superoxid-Dismutase
T	Tera ( $\times 10^{12}$ )
TBA	Thiobarbitursäure
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
T-GSH	Totales Glutathion
U	Einheit
V	Vor der Trainingsbelastung
XO	Xanthin-Oxidase
*	Signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,05$ )

# 1 EINLEITUNG

Nur ein gesundes Pferd kann sportliche Höchstleistungen erbringen. Daher ist es wichtig, die körperliche Belastung der Tiere einschätzen zu können. Trabrennpferde werden über viele Monate auf Renn-Niveau gehalten. Außer den Rennen werden ein- oder zweimal pro Woche anspruchsvolle Trainingseinheiten gefahren. Die Bewältigung dieser körperlichen Leistungen stellt hohe Anforderungen an den gesamten Organismus.

Nach der Belastung des muskuloskeletalen Systems kommt es auch zu immunologischen Reaktionen des Körpers. Die zellulären Veränderungen sind dabei durchaus mit den Reaktionen auf eine akute Erkrankung zu vergleichen. Die hohe Belastung äußert sich außerdem in einer Reihe von Erkrankungen, die Wohlbefinden und Leistungsfähigkeit der Tiere beeinträchtigen. Gleichzeitig kommt es durch Belastung zur gesteigerten Produktion von freien Radikalen, die Gewebeschäden verursachen können. Inwieweit oxidativer Stress ein belastender Faktor für die Tiere, oder eine unerlässliche physiologische Folge der Anstrengung ist, bleibt Gegenstand aktueller Forschung.

Die Verbindung zwischen der immunologischen Zellreaktion und den oxidativen Gewebeschäden bedarf ebenfalls weiterer Aufklärung. Dazu eignet sich die Myeloperoxidase (MPO) in besonderer Weise. Sie stellt aufgrund ihrer Lokalisation in den immunologischen Zellen, als auch wegen ihrer direkten Beteiligung am oxidativen Stress einen interessanten Parameter dar, um die pathophysiologischen Vorgänge, die im Organismus auf Belastung folgen, näher zu untersuchen. Diesbezügliche Studien zeigen die MPO als wertvollen Indikator für entzündliche Reaktionen des Körpers auf Belastung. Aktuelle Untersuchungen weisen der MPO außerdem mediatorische und modulatorische Eigenschaften zu. Es fehlen jedoch Untersuchungen, die die Aussagekraft dieses Markers im Pferdeleistungssport untersuchen, und seine praktischen Aussagekraft prüfen.

Der Einfluss von körperlicher Belastung auf die Aktivität der MPO im Serum wurde beim Pferd bislang nicht untersucht. Außerdem ist nicht bekannt, ob MPO-Aktivitätsveränderungen im Serum mit Veränderungen von belastungsbedingtem oxidativem Stress *in vivo* verbunden sind.

Daher soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag dazu leisten, die Auswirkungen einer Trainingsbelastung unter Feldbedingungen auf Trabrennpferde zu untersuchen. Als neuer Parameter wird die Aktivität der zirkulierenden MPO betrachtet. Da sie zur Produktion von gewebsschädigenden, reaktiven Substanzen führen kann, werden gleichzeitig Schäden durch oxidativen Stress, sowie deren Eliminationszeit verglichen.

Die folgenden Fragen werden nach Abschluss der Studie zu betrachten sein:

- Welche Auswirkung hat eine Trainingsbelastung unter Feldbedingungen auf die Aktivität der MPO im Serum?
- Kann ein Zusammenhang zwischen MPO und anderen physiologischen oder pathologischen Parametern festgestellt werden?
- Kommt es zu oxidativem Stress unter der üblichen Trainingsbelastung, und wie lange bleiben eventuelle Schäden nachweisbar?

Es liegen keine Studien vor, die sich mit dieser Fragestellung im Zusammenhang mit dem Training von Trabrennpferden befassen.

## 2 LITERATUR

### 2.1 Leistungsphysiologie und –pathologie beim Pferd

#### 2.1.1 Einfluss von Belastung auf Laktat, Herzfrequenz und Muskelenzyme

Um die Intensität einer physischen Belastung einschätzen zu können, werden im Pferdeleistungssport routinemäßig mehrere Parameter geprüft. Darunter spielt die Bestimmung der Blutlaktatkonzentration eine wichtige Rolle. Sie erlaubt Aussagen über die aerobe bzw. anaerobe Muskelstoffwechsellage unter Belastung. Laktat ist das Endprodukt des anaeroben Muskelstoffwechsels, der neben dem aeroben in den Muskelzellen abläuft. Unter hohen Belastungen akkumuliert Laktat, da die gesteigerte Produktion die Eliminationskapazität übersteigt. Bei geringeren Belastungen laufen beide Wege in der Zelle ab. Laktat wird jedoch in gleichem Maße eliminiert, wie es gebildet wird. Der aerobe Metabolismus ist zwar der bei weitem effizientere Weg der Adenosintriphosphat (ATP)-Produktion, er kann aber erst mit Verzögerung voll ausgeschöpft werden und ist von dem Mitochondriengehalt der Zelle und einer ausreichenden Sauerstoffversorgung abhängig. Durch die aerobe Glykolyse arbeitet der Muskel bei moderater Belastung und ausreichender Sauerstoffversorgung dauerhaft, ohne dass es zu einer Nettolaktatproduktion kommt (Engelhardt, 2000).

Übersteigt die Laktatproduktion die Eliminationsrate, kommt es bei gleichbleibender oder steigender Belastung zu einem exponentiellen Laktatanstieg (Laktatakkumulation). Der Beginn der Nettolaktatakkumulation wird als Überschreiten der aerob/anaeroben Schwelle definiert. Eine hohe Korrelation der Laktatwerte mit der Geschwindigkeit von Vollblütern wurde bei einer 800 m langen submaximalen Belastung sowohl auf Sand, als auch auf der Grasbahn festgestellt (Davie & Evans, 2000). Die Korrelation zwischen Belastungsintensität und Laktatwert zeigt, dass der Laktatwert ein gutes Maß für die Belastungsintensität ist, da das Ausmaß der Laktatbildung von der Art, der Dauer und der Intensität der Arbeit abhängig ist (Krzywanek, Schulze & Wittke, 1972 a).

Thornton et al. (1983) konnten in einer Untersuchung über die Laktatproduktion zeigen, dass der Laktatspiegel bei gleicher Geschwindigkeit (510 m/min) von im Mittel 9,58 mmol/l nach fünf Wochen Training signifikant auf 5,66 mmol/l sank. Dies zeigt, dass ein Unterschied zwischen einem untrainierten und einem trainierten Pferd besteht, da es zu einer verbesserten Ausdauerleistung durch Steigerung des aeroben Metabolismus kommt (Thornton et al., 1983; Deaton et al., 1999).

Die Konzentration von Laktat im Blut steigt dabei exponentiell zur Arbeitsintensität an (Wilson, Isler & Thornton, 1983). Bei einer submaximalen Ausdauerbelastung kann der Laktatspiegel relativ konstant gehalten werden (Asheim et al., 1970), jedoch schon eine kurzzeitige Maximalbelastung führt zu einem Laktatanstieg im Muskel und im Blut (Harris & Snow, 1988). Die gemessenen Höchstwerte variieren je nach Belastungsart, -dauer und Messverfahren. Unter maximaler Belastung können Werte von circa 30 mmol/l erreicht werden (Rose et al., 1983).

Auch im Ruhezustand ist Laktat im Blut nachweisbar. Beim Pferd werden Werte von unter 1 mmol/l angegeben (Gill et al., 1987; Kraft & Dürr, 2005).

Die Herzfrequenz (HF) während der Belastung ist ebenfalls ein sehr guter Parameter zur Intensitätseinschätzung. Durch den erhöhten Sauerstoffbedarf der Muskulatur wird die HF, die beim Pferd in Ruhe bei etwa 30-36 Herzschläge/Minute (S/min) liegt, um ein Vielfaches

gesteigert (Engelhardt, 2000). Der sogenannte Bainbridge-Reflex, der durch den erhöhten Blutdruck in der rechten Vorkammer ausgelöst wird, führt innerhalb von Sekunden zu einer reflektorischen Steigerung der HF bei Belastung, wobei sie nach ungefähr 22 Sekunden unter maximaler Belastung einen maximalen Wert erreicht (Krzywanek et al. 1970). Jede Geschwindigkeitsänderung während der Belastung verändert die Belastungsintensität und geht mit einer sofortigen Anpassung der HF einher (Krzywanek et al., 1970).

Da der Sauerstoffbedarf sich proportional zur Intensität verhält (aufgrund der Erhöhung des Energiestoffwechsels), kann das Ausmaß der Steigerung der HF als indirekter Intensitätsparameter eingesetzt werden (Couroucé, 1998).

Zwischen 120 und 210 S/min besteht eine lineare Beziehung zwischen HF und Geschwindigkeit (Wilson, Isler & Thornton, 1983). Unter extremer Belastung konnten beim Pferd Maximalwerte von 240 S/min gemessen werden (Asheim et al., 1970). Obwohl die HF bei geringer Belastung durch exogene Faktoren, wie beispielsweise Stress, Angst oder Schmerz beeinflusst werden kann, ist ab einer HF von 120 S/min eine weitere Erhöhung durch exogene Faktoren nicht mehr möglich (Persson, 1968).

Ehrlein und Kollegen untersuchten verschiedene Belastungsintensitäten sowohl im Trab, als auch im Galopp und stellten fest, dass der Anstieg der HF umso höher ist, je höher die konstante Laufgeschwindigkeit ist (Ehrlein et al., 1973).

Ein Trainingseffekt, der in einer niedrigeren HF bei gleicher Belastungsintensität resultiert, wurde in verschiedenen Studien bereits nachgewiesen (Ehrlein et al., 1973; Gottlieb-Vedi et al., 1995).

Das verstärkte Vorhandensein bestimmter Muskelenzyme im Blut gibt Auskunft über den Zustand der Muskelzellen und wird als Parameter für akute oder chronische belastungsbedingte Zellschäden eingesetzt (Valberg et al., 1993).

Die Kreatin-Kinase (CK) ist als muskelspezifisches Enzym anzusehen, das nur in sehr geringen Mengen in anderen Organen, wie der Niere, der Leber und dem Gehirn vorkommt. Der bei weitem überwiegende Teil findet sich in der Skelettmuskulatur und in der Herzmuskulatur. Im Gegensatz zu anderen diagnostischen Enzymen im Bereich der Myopathien kann die CK auch allein als relativ spezifischer Indikator für Muskelschäden herangezogen werden (Argiroudis, Kent & Blackmore, 1982; Anderson, 1976).

In der Muskelzelle befindet sich die CK im Plasma, wo sie die folgende Reaktion katalysiert und daher für die frühe Energieversorgung der arbeitenden Zelle verantwortlich ist. Abbildung 1 zeigt die Reaktionsgleichung der CK.



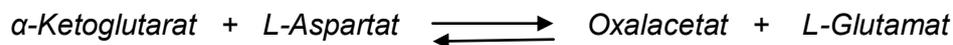
**Abbildung 1: Reaktionsgleichung der Kreatin-Kinase**

Die in der Literatur angegebenen Referenzwerte sind für das Pferd in Ruhe variabel. Sie reichen von < 90 U/l (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 1982), bis 75 – 160 U/l (Sloet & Goering, 2000).

Fünf Stunden nach Belastungsende wurden nach Anderson die höchsten Werte der CK ermittelt, die nach 2 bis 3 Tagen wieder Ruhenniveau erreichen. Damit hat die CK eine deutlich kürzere Halbwertszeit, als die Aspartat-Amino-Transferase (AST) (Anderson, 1976). Die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft gibt für das Pferd einen Arbeitswert von bis zu 220 U/l an (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 1982).

Obwohl die CK eine Aussage über akute Muskelschäden erlaubt, stand sie bei der Untersuchung von Kerr und Snow (1983) nach einem Distanzritt in keinem Zusammenhang mit dem Erschöpfungsgrad der Tiere und wies eine relativ hohe Variabilität auf (Kerr & Snow, 1983). Dennoch ist die Höhe des Anstiegs der CK im Serum nachweislich von der Arbeitsintensität abhängig, und steigt nach maximaler Belastung an (Lekeux et al., 1991; Rose et al., 1983).

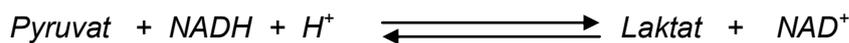
Die AST kommt sowohl im Mitochondrium, als auch im Zytosol vor, und die von ihr katalysierte Gleichgewichtsreaktion ist ein wichtiger Teil des oxidativen Stoffwechsels. Abbildung 2 zeigt die Reaktionsgleichung der AST.



**Abbildung 2: Reaktionsgleichung der Aspartat-Amino-Transferase**

Sie wird als unspezifischer (da ubiquitär vorkommender), aber sensitiver Parameter für akuten Zellschaden eingesetzt. Sie ist sowohl bei Zellnekrosen als auch schon bei Membranschäden erhöht (Schmidl, 1985). Bei Skelettmuskelerkrankungen, wie Myopathien und Tetanus und bei Myokardiopathien können extrem hohe Werte auftreten (Gerber, 1969). Sehr hohe Werte können auch bei Leberschäden infolge akuter Hepatitis und bei Vergiftungen angetroffen werden. Die Auswertung der AST erfolgt meist zusammen mit der CK. Als Referenzbereich für die AST gibt die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft einen Wert von < 90 U/l an (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 1982). Schäfer sieht dagegen Werte bis 220 U/l als physiologisch an (Schäfer, 1999). Grün und Kollegen beobachteten bei erhöhter Trainingsintensität neben signifikanten Unterschieden zwischen Ruhe- und Belastungswerten auch eine Steigerung der Enzymaktivität in Ruhe. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Steigerung der Trainingsintensität, deutliche Veränderungen auch in Ruhe hervorruft (Grün et al., 1977).

Die Laktat-Dehydrogenase (LDH) ist ebenfalls kein muskelspezifisches Enzym. Sie dient, wie in Abbildung 3 dargestellt, innerhalb der Zellen der Oxidierung von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) + H<sup>+</sup> zu NAD<sup>+</sup> durch Reduktion von Pyruvat zu Laktat im Rahmen des anaeroben Zellstoffwechsels.



**Abbildung 3: Reaktionsgleichung der Laktat-Dehydrogenase**

Obwohl die LDH durch diese Reaktion mit der Laktatproduktion verbunden ist, konnten bei Belastungsstudien nicht immer Korrelationen zwischen den beiden Parametern festgestellt werden (Ober, 2000).

Die LDH reagiert empfindlich auf akute Zellschäden und ist dann extrazellulär auffindbar (Gerber, 1969) und hat laut Glitz (1997) eine Halbwertszeit von 7,65 Stunden. Da die LDH als ubiquitär im ganzen Körper vorkommendes Enzym anzusehen ist, können erhöhte Werte nicht zu einer organspezifischen Diagnose herangezogen werden (Glitz, 1997).

Der Referenzbereich der LDH liegt < 400 U/l (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 1982). Sloet und Göring (2000) geben beim erwachsenen Pferd (> 2 Jahre) Referenzwerte zwischen 150 und 420 U/l an (Sloet & Goering, 2000).

Während es grundsätzlich nach einer Belastung zu einem intensitätsabhängigen Anstieg der LDH beim Pferd kommt, sind die Aussagen über Trainingsadaptation widersprüchlich. Training mit einer deutlichen anaeroben Komponente, führt zu einer Zunahme der LDH-Aktivität (Rose et al., 1983; Lekeux et al., 1991).

### 2.1.2 Einfluss von Belastung auf das leukozytäre Blutbild

Basierend auf den humoralen und zellulären Veränderungen, die während anstrengender muskulärer Arbeit beim Menschen vorkommen, wurde das Konzept der entzündlichen Antwort auf Belastung entwickelt. Beweisend dafür sind bis heute die Zeichen einer Akuten-Phase-Antwort (Niemann, 1997), eine Leukozytose und Leukozyten-Aktivierung, entzündliche Mediatoren, Zellschäden, zelluläre Infiltration, Produktion von freien Radikalen, Aktivierung des Komplementsystems und fibrinolytische Stoffwechselfvorgänge (Camus et al., 1993 b).

Die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten bilden, wegen ihrer überwiegenden Anzahl (granulozytäres Blutbild des Pferdes) und aufgrund ihrer Fähigkeit zur Migration ins Gewebe, sowie zur Phagozytose und Abtötung von Infektionserregern oder Zelltrümmern, einen wichtigen Teil des zellulären Immunsystems. Ihre Aktivierung und Migration (bestehend aus endotheliale Rollen, Adhäsion, Aktivierung, Diapedese und chemotaktischer Motilität), wird durch Chemotaxine ausgelöst. Zu den Stoffen, die eine Aktivierung der Granulozyten erzeugen zählen Zytokine (IL-1, TNF- $\alpha$ ), Chemokine (IL-8), LPS, Eikosanoide (Leukotrien B<sub>4</sub>), plättchenaktivierender Faktor (PAF – *in vitro*), Komplementfaktoren (humaner rekombinanter Komplementfaktor C5a – *in vitro*) und Immunkomplexe (Antigen-Antikörper) (Ali et al., 1997). Dabei kann es sich sowohl um Zelltrümmer nach mechanischer Zellzerstörung, oder um freigesetzte chemotaktische Substanzen anderer Immunzellen, sowie um opsonisierte Pathogene oder Zellwandbestandteile von Bakterien selbst handeln. Nur aktivierte Granulozyten können fest an die Gefäßwand gebunden werden. Dabei setzen sie eine Vielzahl von Proteasen, wie unter anderem Elastase, Kollagenase, Proteinase und Kathepsin G frei. Gleichzeitig steigt der Sauerstoffverbrauch um ein Vielfaches (der sogenannte „*respiratory burst*“), da durch die Aktivierung der membrangebundenen Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase die Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen [zum Beispiel Superoxid und Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)] aus Sauerstoff beginnt. Diese reaktiven Verbindungen dienen im Rahmen der Infektabwehr der Zerstörung von phagozytierten Pathogenen. Wasserstoffperoxid wird dabei von der MPO zur Bildung hypohalogener Säure benötigt (Gaut et al., 2001).

Abhängig von der Intensität und der Dauer der Belastung ist es wahrscheinlich, dass Muskel und/oder benachbartes Gewebe geschädigt werden, was die Aktivierung der Granulozyten zur Folge hat. Ob diese Aktivierung, die mit der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS-Molekülen) einhergeht letztlich ein primär pathologischer, oder physiologischer Prozess ist, wird diskutiert (Duarte et al., 1993).

Die physiologische Leukozytenverteilung beim Pferd besteht wie auch bei anderen Säugetieren aus einem zirkulierenden Pool und einem sogenannten marginalen Pool an Zellen, die sich in den Kapillarbetten und der Milz befinden, und in etwa 50 % der Gesamtleukozytenzahl ausmachen. Unter bestimmten Umständen (wie zum Beispiel körperliche Anstrengung) werden diese in die Zirkulation abgeschwemmt. Beim Menschen und den meisten anderen Spezies resultiert Belastung daher in physiologischer Leukozytose verbunden mit einer Mobilisation der neutrophilen Granulozyten in den zirkulierenden Pool und einer moderaten bis merklichen Neutrophilie (Carakostas, Moore & Smith, 1981).

Belastung äußert sich außerdem in einem veränderten Verhältnis der Neutrophilen zu den Lymphozyten (Neutrophile (N)/Lymphozyten (L)-Verhältnis). Die Intensität der Belastung spielt hierbei eine große Rolle. Das Verhältnis ist nach moderateren Belastungen eher erniedrigt, da relativ gesehen mehr Lymphozyten als Neutrophile in die Zirkulation freigesetzt werden. Geringere Intensitäten produzieren demnach eine andere Veränderung im Leukogramm, als hohe, die mit einer merklichen Leukozytose aufgrund von Neutrophilie, Lymphopenie und Eosinopenie verbunden sind (Snow, Ricketts & Mason, 1983).

Das erhöhte N/L-Verhältnis nach hohen Belastungen ist ein Resultat des Kortisols, dessen Ausschüttung mit der Belastungsintensität korreliert und die Leukozytose verstärkt (Wong, Smith & Thong, 1992). Erhöhte Plasmakortisolkonzentrationen führen zu erniedrigter

Margination der Neutrophilen, erhöhtem neutrophilen Output aus dem Knochenmark und erniedrigter Zirkulation von Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten. Die Erhöhung der zirkulierenden Zahl der Neutrophilen aufgrund von Kortisol geht jedoch nicht automatisch mit einer Aktivierung einher (Camus et al., 1993 a). Bei zunehmender Belastung verstärkt sich die Neutrophilie und Lymphopenie. Nach mehreren separaten Belastungen wurde beim Traber ein über 6 Stunden anhaltendes erhöhtes N/L-Verhältnis festgestellt, das mit einer Leukozytose, und erhöhter ROS-Produktion einherging (Korhonen et al., 2000).

Da die Intensität und Dauer einer Belastung zu unterschiedlichen Veränderungen des Leukogramms führen, sind zelluläre Reaktionen des Körpers durchaus als Intensitätsparameter geeignet (McGowan, 2008).

Eine physiologische Besonderheit des Pferdes ist die Milzkontraktion, die während Belastung zu einer Steigerung der Erythrozytenzahl führt, wodurch das Ausmaß einer Leukozytose „maskiert“ werden kann. Das Ausmaß der Milzentspeicherung ist ebenfalls von der Stärke der körperlichen Anstrengung abhängig (Snow, Ricketts & Mason, 1983).

## 2.2 Die Myeloperoxidase

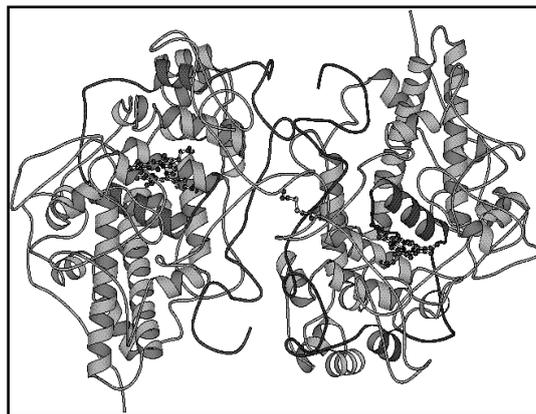
### 2.2.1 Synthese und enzymatische Aktivität

Das Enzym MPO gehört zur Gruppe der Peroxidasen und wurde in Studien an Säugetieren und Fischen als Indikator für Leukozyten-Aktivität und damit verbundener Entzündung im Zusammenhang mit pathologischen Zuständen eingesetzt (Art et al., 2006 a; Fietz et al., 2007).

Die MPO wird in den azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten gespeichert. In geringen Mengen kommt sie auch in Monozyten vor, lässt sich jedoch in ausgereiften Makrophagen nicht mehr nachweisen (Klebanoff, 1999; Mathy-Hartert et al., 1996).

Die Synthese der MPO beginnt bereits im Promyelozytenstadium und endet, wenn die neutrophilen Granulozyten in das Myelozytenstadium eintreten. An diesem Punkt werden die azurophilen Granula auf die Tochterzellen verteilt, wo sie sich mit den neu geformten peroxidase-negativen Granula mischen. Daher sind die MPO-haltigen Granula der ausgereiften Neutrophilen, sowohl in Dichte, als auch in ihrer Morphologie, heterogen (Kinkade et al., 1983; Bainton, Ulliyot & Farquhar, 1971).

Die genetische Kodierung der humanen MPO befindet sich auf einem einzigen, ~ 11 kb großen, Bereich in Segment q 12-24 im langen Schenkel des 17. Chromosoms (Inazawa et al., 1989; Zaki et al., 1990).



**Abbildung 4: Dimerstruktur der Myeloperoxidase (Fenna, Zeng & Davey, 1995).**

Das erste Transkriptionsprodukt bildet ein etwa 80 Kilodalton (kDa) schweres Protein (Nauseef, Olsson & Arnljots, 1988). Dieses wird nach proteolytischer Abspaltung eines Aminosäuresignalpeptids und einer Glykosylierung, durch Aufnahme einer mannose-reichen Seitenkette, zum enzymatisch inaktiven apoproMPO-Molekül (Johnson & Nauseef, 1991). Innerhalb des endoplasmatischen Retikulums formt die apoproMPO einen Komplex mit den Kalzium-bindenden Proteinen Calreticulin und Calnexin. Erst durch die calnexinabhängige Aufnahme der prosthetischen Hämgruppe (im Unterschied zu anderen Peroxidasen bei der MPO mit drei Bindungen), entsteht das enzymatisch aktive proMPO-Molekül mit einem Gewicht von 89-90 kDa (Pinnix et al., 1994). Diese proMPO verlässt nun das Endoplasmatische Retikulum und gelangt in ein prä-granuläres Kompartiment, wo sie zur reifen MPO wird (Nauseef, McCormick & Goedken, 2000).

Die proteolytische Entfernung einer N-terminalen Aminosäure-pro-Region und eine zweite proteolytische Spaltung resultieren in einer schweren, glykolysierten  $\alpha$ -Untereinheit mit 467 Aminosäuren (57-64 kDa) und der leichten, nicht glykolysierten  $\beta$ -Untereinheit mit 112

Aminosäuren (12-15 kDa), die sich als schwer-leichte Protomerverbindung zusammenschließen (Klebanoff, 2005).

Reife MPO besitzt eine Molekularmasse von 120-150 kDa (Serteyn et al., 2003) und besteht aus zwei dieser schwer-leichten Protomerverbindungen, deren schwere Untereinheiten durch eine Disulfidbindung verbunden sind (Nauseef, McCormick & Goedken, 2000; Serteyn et al., 2003). Da sie für die grünliche Färbung von Eiter verantwortlich ist, wurde die MPO zu Anfang auch als Verdoperoxidase bezeichnet (Agner, 1941).

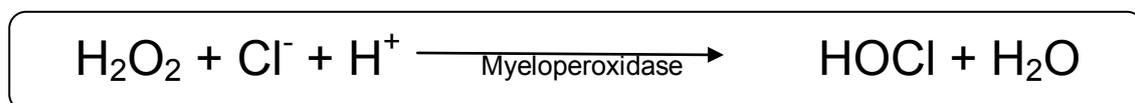
Die MPO ist ein stark basisches Protein, da sie viele basische Aminosäuren wie Arginin und Lysin enthält. Ihr isoelektrischer Punkt liegt bei  $>10$  und daher bindet sie leicht an negativ geladene Oberflächen, wie zum Beispiel biologische Membranen, oder die negativ geladene Oberfläche von Granulozyten (Klebanoff, 1999). Das mannose-reiche Karbohydrat und die zwei Häm-Reste sind kovalent an die schweren Untereinheiten gebunden (Olsen & Little, 1984). Reduktion und Alkylierung resultieren in der Spaltung von MPO in Hemi-MPO, die aus einer einzigen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit besteht. Dieses Produkt besitzt nach Andrews et al. noch enzymatische und bakterizide Aktivität (Andrews, Parnes & Krinsky, 1984).

Im Jahre 1998 gelang es Mathy-Hartert und Mitarbeitern, die equine MPO zu purifizieren. Sie stellten eine starke Ähnlichkeit der equinen mit der humanen und der bovinen Form des Enzyms fest. Die spezifische Aktivität der equinen MPO betrug 74,3 U/mg und sie konnten sowohl enzymatisch aktive proMPO, als auch reife MPO in Granulozyten nachweisen (Mathy-Hartert et al., 1998).

Als Enzym der zellulären Abwehr im Rahmen des „*respiratory burst*“ wirkt die MPO in den Phagolysosomen mikrobizid auf phagozytierte Pathogene, indem sie Hypochlorsäure (HOCL) als starkes Oxidans bildet. Gelangt die MPO während des „*respiratory burst*“ in den extrazellulären Raum, richten sich ihre toxischen Eigenschaften auch gegen körpereigene Gewebe (Gaut et al., 2001; McConnico et al., 1999).

Die von der MPO katalysierte Reaktion ist eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -abhängige Oxidation eines Haliden zu einer schwachen Säure. Das hierbei oxidierte Anion ist aufgrund der hohen physiologischen Konzentration im Organismus typischerweise ein Chloridanion ( $\text{Cl}^-$ ), obwohl chemisch gesehen die Affinität zu Iodid am größten ist (Klebanoff, 2005). Als weitere Halide können auch Bromidanionen mit der MPO reagieren (Gaut et al., 2001). Bildet Nitrit den Reaktionspartner, dann entsteht das nitrierende Agens Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ). Neben Nitrit können auch Tyrosin, Thiocyanat und Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}$ ) als nicht-Halide durch die MPO oxidiert werden. Auf diese Weise generiert die MPO nicht nur radikalische Substanzen, sondern kann auch eine Rolle bei der Produktion oder Elimination modulatorisch wirkender Moleküle spielen (Serteyn et al., 2003).

Die Reaktionsgleichung ist in Abbildung 5 dargestellt.

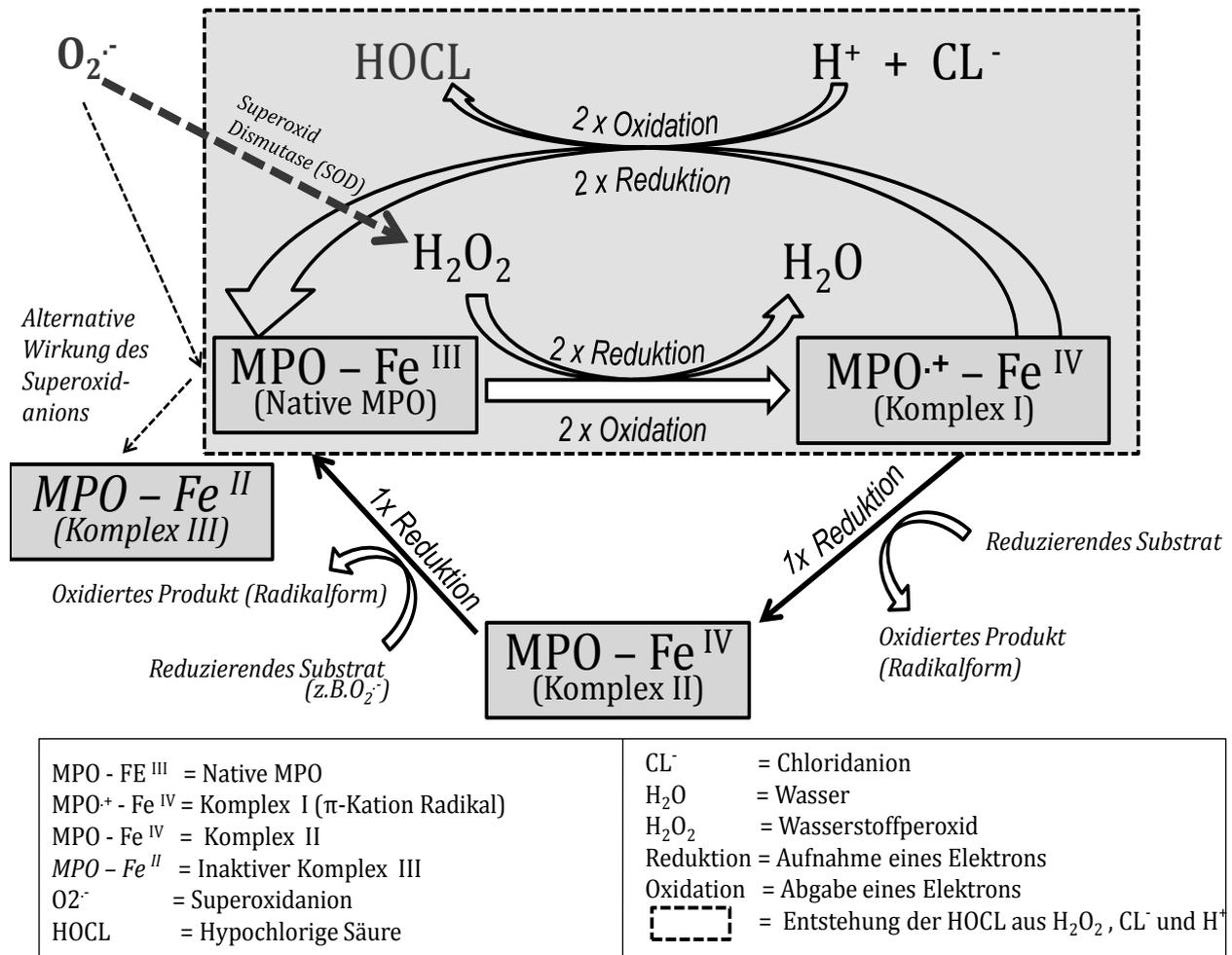


**Abbildung 5: Reaktion der Myeloperoxidase mit Wasserstoffperoxid und Chloridanion.**

Im Rahmen dieser Gleichung kommt es zu mehreren chemischen Reaktionen, die praktisch gleichzeitig ablaufen. Dabei kann das Enzym in vier verschiedene Formen übergehen (Klebanoff, 2005). Zur besseren Veranschaulichung sind einige Detailvorgänge in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

In der nativen MPO liegt das Eisen im MPO-Molekül in dreiwertiger Form ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ) vor. Wasserstoffperoxid reagiert schnell mit diesem Eisen und es bildet sich eine Doppelbindung des Eisens zu einem Sauerstoffmolekül. Dadurch geht die MPO in den intermediären Komplex I über. Dieser zeichnet sich durch das sogenannte  $\pi$ -Kation-Radikal, sowie durch seine Kurzlebigkeit aufgrund hoher Reaktivität aus (Serteyn et al., 2003).

Der Komplex I reagiert sehr schnell mit einem Halogeniden, Pseudohalogeniden oder Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) (Klebanoff, 1999).



**Abbildung 6: Reaktionsgleichung der Myeloperoxidase im Detail. Modifiziert nach Serteyn und Kollegen, 2003; Klebanoff, 1999.**

Aufgrund seiner hohen Reaktivität kann der Komplex I aber auch durch zwei einzelne Reduktionen mit einem reduzierenden Substrat oder mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (wenn dieses in sehr hoher Konzentration vorliegt) (Klebanoff, 2005) wieder zum nativen Enzym werden. Hierbei entsteht der Komplex II als Zwischenstufe. Dieser hat keine katalytischen Fähigkeiten und muss erst durch einen zweiten Elektronendonator wieder in das native Enzym überführt werden. Solche Elektronen abgebenden Stoffe sind unter anderem  $\text{NO}_2^-$ , NO, Ascorbinsäure, Harnstoff, Katecholamine, Östrogene, Serotonin oder Tyrosin (Serteyn et al., 2003). Durch die Oxidation gehen diese Stoffe in ihre Radikalform über und können so zur Formation von Radikalen beitragen. Stickstoffmonoxid wird beispielsweise zu  $\text{NO}_2^-$ , das ein nitrierendes Agens und damit ein reaktives Radikal darstellt (Eiserich et al., 1998). Außerdem ist besonders das Tyrosyl-Radikal zu nennen, welches nach Podrez et al. eine Rolle bei der Lipidperoxidation spielt (Podrez, Abu-Soud & Hazen, 2000).

Freie MPO kann inaktiviert, oder durch die Aufnahme in Makrophagen aus dem extrazellulären Raum entfernt werden (Edwards, Nurcombe & Hart, 1987; Klebanoff, 2005). Eine Inaktivierung kann durch eine Reihe von Substanzen, wie zum Beispiel Resveratrol herbeigeführt werden. Das Phytoalexin Resveratrol, das antioxidative, antientzündliche und immunmodulatorische Eigenschaften besitzt, führt zu einer signifikanten Hemmung der MPO-Aktivität sowohl intra- als auch extrazellulär (Kohnen et al., 2007). Eine ähnliche Wirkung erzielten Franck und Kollegen (2006) auch durch Curcumin. Sie erwägen die

Möglichkeit, dass Resveratrol die Enzymstruktur der MPO verändert (Franck, Grulke & Deby-Dupont, 2006).

Auch Produkte des „*respiratory burst*“ selbst können die MPO inaktivieren. Die MPO kann beim Vorliegen von hohen Konzentrationen an  $O_2^-$  oder auch  $H_2O_2$  in einen inaktiven Komplex übergehen (Edwards, Nurcombe & Hart, 1987; King, Jefferson & Thomas, 1997). Durch die Aufnahme von Elektronen wird die potentiell toxische MPO im Organismus so gehemmt und gleichzeitig der oxidative Druck gesenkt. Dadurch kann aktive MPO zu einer Verminderung reaktiver Substanzen beitragen (Winterbourn, 1986).

Die Inaktivierung der MPO kann *ex vivo* grundsätzlich auch durch weitere Substanzen herbeigeführt werden (Castro et al., 2008; Rebiere et al., 2008; Quian, Eaton & Wolff, 1997).

Die Frage, inwieweit die mikrobiziden Eigenschaften der MPO im Organismus bei der Infektabwehr unverzichtbar sind, wird kontrovers diskutiert (Klebanoff, 2005).

Zunehmend werden auch die extramikrobiziden Eigenschaften der MPO untersucht (Kebir et al., 2008). Ihr diagnostischer und prognostischer Wert, sowie ihre pathologischen Wirkungen im Rahmen humaner kardiovaskulärer Erkrankungen stehen mittlerweile außer Frage (Cavusoglu, Ruwende & Eng, 2007; Richter et al., 2005; Buffon et al., 2002).

### 2.2.2 Extramikrobizide Wirkungen

Sowohl über ihre Reaktionsprodukte, als auch durch direkte Interaktion nimmt die MPO Einfluss auf Prozesse der akuten Entzündung. Sie verringert beispielsweise durch Oxidierung die biologische Verfügbarkeit von NO. Stickstoffmonoxid wird in den Endothelzellen durch die kalziumabhängige NO-Synthase gebildet. Unter Belastung fanden Niess und Mitarbeiter eine Zunahme der induzierbaren NO-Synthase (Niess et al., 2000).

Das Enzym benötigt Arginin als Substrat, und wandelt gleichzeitig NADPH in  $NADP^+$  um. Das entstandene NO diffundiert in den Interzellularraum und in die Tunica media (Muskelschicht) der Gefäße. Hier aktiviert es die zytosolische Guanylcyclase, was schließlich eine Gefäßdilatation zur Folge hat. Als gefäßrelaxierendes und antientzündliches Molekül spielt NO eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen, das in erheblichem Ausmaß von Veränderungen des Gefäßlumendurchschnitts und des Gefäßendothels abhängt (die Transmigration aktivierter L wird erst durch eine gesteigerte Gefäßpermeabilität möglich). Die Dilatation der Gefäße ist ausschlaggebend für die benötigte Durchblutungssteigerung der Muskulatur und der Lunge bei Belastung. Da die MPO mit hoher Affinität an die Gefäßwand bindet und in aktiver Form im subendothelialen Raum akkumuliert, ist eine große räumliche Nähe zum NO gegeben (Klinke, 2009). Die von der MPO gebildete HOCl oxidiert NO zu  $NO_2^-$  (Eiserich et al., 1998).

Gleichzeitig kann L-Arginin, das Substrat der NO-Synthase, durch HOCl chloriniert werden und dadurch ebenfalls zur Verringerung des NO beitragen (Zhang et al., 2001; Lin et al., 2006). Auch andere, relevante Moleküle werden durch HOCl modifiziert und führen zu Beeinträchtigungen der Gefäßwandfunktionen (Vissers & Thomas, 1997; Vita et al., 2004).

Die MPO wirkt rezeptorvermittelt auch direkt modulierend auf die Funktion der Leukozyten. Auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten befinden sich Integrine (CD11b-Integrine), die als Rezeptoren für die MPO dienen. Über diesen Mechanismus kommt es nach Bindung der MPO zu einer Modifikation intrazellulärer Proteine, sowie zu erhöhter Aktivität und vermehrter Expression dieser Integrine (Lau et al., 2004).

Außerdem wird über das CD11b-Integrin ein MPO-vermittelter Mechanismus aktiviert, der die Apoptose aktivierter Granulozyten verhindert. Auf diese Weise bleiben die aktiven Entzündungszellen länger vorhanden und die Entzündungsreaktion wird verstärkt und verlängert (Kebir et al., 2008; Lau et al., 2004).

*In vitro* konnte zudem eine MPO vermittelte Adhäsion von Granulozyten an eine Plastikoberfläche festgestellt werden (Johannsson et al., 1997). Da das Enzym im Organismus mit hoher Affinität an bestimmte Strukturen der endothelialen Oberfläche bindet, wurde die Hypothese entwickelt, dass die MPO *in vivo* als Verbindungselement zwischen dem Endothel und den Granulozyten dienen könnte. Die Ergebnisse der Arbeit von Klinke (2009) zeigen, dass dieser Mechanismus existiert. Es kann jedoch keine abschließende Aussage über seine Bedeutung *in vivo* getroffen werden, da es sich bei der Adhäsion der Granulozyten an die Gefäßwand im lebenden Organismus um ein hochkomplexes Geschehen handelt (Klinke, 2009).

Der Einfluss der MPO auf die Chemotaxis der aktivierten neutrophilen Granulozyten ließ sich ebenfalls nachweisen. Aktivierte Granulozyten zeigen eine gerichtete Motilität zur MPO im Gewebe, die nicht auf deren katalytische Eigenschaften zurückzuführen ist, sondern vermutlich auf elektrostatischen Interaktionen zwischen dem kationischen MPO-Molekül und einem negativ geladenen Gegenstück beruht (Klinke, 2009).

Dass körperliche Belastung ein spezifischer Auslöser zytotoxischer Aktivitäten der Leukozyten ist, zeigen die *in vitro*-Studien von Nguyen. Die Leukozyten zeigten sich erst nach Belastung aktiv und zytotoxisch. Nur ein Zusammenspiel der belasteten Muskelzellen, der MPO und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte zu den *in vivo* beobachteten entzündlichen Reaktionen (Nguyen, Lulis & Tidball, 2005).

### 2.2.3 Physische Belastung

Im Rahmen der zellulären Pathogenabwehr konnte bei Menschen und Labornagern ein Zusammenhang zwischen dem Fehlen von MPO und der Abwehrfähigkeit gegen bestimmte Pilz oder Bakterieninfektionen festgestellt werden (Klebanoff, 2005; Gaut et al., 2001). Andere Untersuchungen weisen ihr Potential als Parameter der entzündlichen Immunantwort und Zellschädigung in pathologischen Zuständen nach (Art et al., 2006 a; Eiserich et al., 1998).

Bei *in vivo* Untersuchungen an MPO-knockout-Mäusen (die keine MPO synthetisieren können) im Vergleich zu einer Wildtyppopulation konnten Nguyen et al. in Abwesenheit von MPO eine über 50 % verminderte Lyse von Skelettmuskelzellen nach Belastung feststellen (Nguyen, Lulis & Tidball, 2005).

Diese entzündliche Immunreaktion auf Belastung, die mit Aktivierung der zellulären Abwehr einhergeht, wird als ein Teil der physiologischen Zellerneuerung im Rahmen der Trainingsadaptation gesehen (Camus et al., 1993 b; Morozov et al., 2006). Hier wird häufig der Begriff Umbau (engl.: *Remodeling*) eingesetzt. Die Zerstörung und Erneuerung der Zellen führt zu einer besseren Anpassung des Gewebes an die geforderte Belastung (Camus et al., 1993 b; Morozov et al., 2006).

Inwieweit die Aktivierung der Leukozyten, sowie ihre zellschädigenden Eigenschaften in diesem Zusammenhang pathologische Auswirkungen haben, und in welchem Rahmen sie noch als physiologisch anzusehen sind, bleibt *in vivo* fraglich (Duarte et al., 1993). Die MPO dient als Indikator für die Aktivierung und Degranulation neutrophiler Granulozyten. Im Gewebe wird ihre Konzentration auch als Maß für die Zellmigration der Immunzellen nach Belastung eingesetzt (Morozov et al., 2006).

Besonders hohe Gehalte an MPO wurden nach Belastung in den roten Muskelzellfasern (Typ I-Faser) der Skelettmuskeln von Nagern nachgewiesen (Morozov et al., 2006). Diese Fasern weisen das dichteste Kapillarnetz und die höchste Mitochondriendichte auf und sind so in der Lage, besonders den oxidativen/aeroben Stoffwechsel zur Energiegewinnung heranzuziehen. Über eine unvollständige Reduktion bedingt ein erhöhter Sauerstoffumsatz im Rahmen des aeroben Stoffwechsels eine vermehrte Produktion von Sauerstoffradikalen (beispielsweise das Superoxidationradikal), die zu oxidativen Zellschäden führen und der MPO als Substrat zur Generierung weiterer Oxidantien dienen. Im Jahr 2010 fanden Franck und Kollegen bei drei von sieben Pferden nach Belastung einen deutlichen Anstieg der MPO

in Muskelbiopsaten. Bei diesen Pferden wurden gleichzeitig deutlich erhöhte CK-Werte gemessen. Die restlichen vier Probanden der Untersuchung wiesen keine Veränderungen der MPO-Werte im Muskel auf und nur eine moderate Erhöhung der CK (Franck et al., 2010).

In Muskelbiopsaten von acht Sportpferden wurden 23 Proben aus dem Bereich der Schultermuskulatur mit 23 Proben aus der langen Sitzbeinmuskulatur (am Hinterbein) miteinander verglichen. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den MPO-Werten (Franck et al., 2010).

Durch Training verbessert sich langfristig die antioxidative Kapazität des Organismus (Avellini, Silvestrelli & Gaiti, 1995), unter anderem durch vermehrte Expression antioxidativer Enzyme (Ji, 1999). Bei den Untersuchungen von Morozov und Kollegen im Jahr 2006, wurde die intramuskuläre MPO-Konzentration nach Belastung bei trainierten und untrainierten Mäusen verglichen. Der Trainingszustand der Probanden beeinflusste hierbei die MPO-Konzentration im Gewebe. Die MPO-Konzentration war in trainierter Muskulatur nach Belastung deutlich geringer als in untrainierter, was auf eine verminderte entzündliche Reaktion hinweist (Morozov et al., 2006).

Anhand von Aktivitäts- und Quantitätsmessungen im Gewebe verschiedener Organe belegten Belcastro und Mitarbeiter (1996), dass die Steigerung der MPO-Menge und -Aktivität sich nicht nur auf den Skelettmuskel beschränkt. In Proben von Leber-, Herz- und Skelettmuskeln belasteter Ratten, wiesen sie in allen drei Geweben einen Anstieg der MPO-Aktivität nach. Die größte Zunahme fanden sie dabei im Herz- und Lebergewebe (Belcastro et al., 1996). Bei dieser Studie handelt sich um die ersten Erkenntnisse zur quantitativen Bestimmung der MPO in Geweben verschiedener Organe belasteter Tiere. Dabei stellt sich die Frage, wodurch es zur Leukozyten-Aktivierung, Migration und MPO-Freisetzung unter Belastung kommt. Weiterhin ist von Interesse, ob diese Leukozyten-Aktivierung allein durch Kraftentwicklung oder mechanische Zellschäden innerhalb der Muskulatur erfolgt, oder ob lösliche Mediatoren beteiligt sind (Nguyen, Lusic & Tidball, 2005). Die Ergebnisse unterstreichen außerdem, dass es sich bei der entzündlichen Reaktion des Organismus auf Belastung um eine generalisierte Aktivierung der Leukozyten handelt, die sich nicht nur auf die Muskelzellen beschränkt (Belcastro et al., 1996).

Bislang konnte die Veränderung der MPO durch Belastung nur mit wenigen anderen Parametern in direkte Korrelation gebracht werden. Hier ist neben der CK auch die neutrophile Elastase zu nennen, die in Untersuchungen bei Pferden mit den Veränderungen der MPO korrelierte (Franck et al., 2010; Serteyn et al., 2010). Auch der Gehalt an Leukozyten im Blut kann mit der MPO korrelieren. Dabei scheint die Menge der Leukozyten im Blut mit der quantitativ gemessenen MPO nicht grundsätzlich positiv zu korrelieren (Art et al., 2006 b).

Neben der Zunahme der MPO-Konzentration im Blut (Camus et al., 1993 a; Morozov et al., 2006), und im Gewebe, kommt es gleichzeitig zu einer erhöhten Aktivität der MPO in den genannten Organen. Auch hier zeigt sich die größte Steigerung nicht in der Skelettmuskulatur, sondern im Leber- und Herzgewebe (Belcastro et al., 1996).

Im Gegensatz zur einer vermehrten Aktivität der MPO im Gewebe, ließ sich jedoch bislang innerhalb der Neutrophilen keine Aktivitätszunahme in Folge körperlicher Arbeit nachweisen (Donovan et al., 2007). Donovan und Kollegen fanden 2007 *ex vivo* sogar eine über 72 Stunden verminderte ROS-Produktion nach intensiver Belastung beim Pferd. Während sich die Aktivität der MPO in den Neutrophilen nicht veränderte, machen die Autoren keine Angaben darüber, ob sich der Gehalt der MPO in den Zellen verringert hat (Donovan et al., 2007).

Einen solchen verringerten Gehalt innerhalb der Neutrophilen (bei gleichzeitigem MPO-Anstieg im Blut) stellten Morozov und Kollegen (2003) bei belasteten Ratten fest. Auch ihre Untersuchungen belegen die verminderte Fähigkeit zum „*respiratory burst*“ der Neutrophilen drei bis sechs Stunden nach Belastung (Morozov et al., 2003).

Dass eine verminderte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies während körperlicher Arbeit zu einer herabgesetzten entzündlichen Immunreaktion führt, ließ sich ebenfalls bereits nachweisen (Lin et al., 2006) und belegt die enge Verbindung zwischen belastungsbedingter Entzündungsreaktion und der Entstehung von ROS.

Inwieweit sich der Aktivitätszustand und die Gewebekonzentration der MPO nach Belastung modulieren lässt, ist ebenfalls von Interesse. Nach L-Arginin-Supplementation wiesen belastete Ratten deutlich niedrigere Werte von CK, LDH, Xanthin-Oxidase (XO) und Malondialdehyd (MDA) im Herzen auf, als nicht L-Arginin-Supplementierte. Die Ergebnisse der Untersuchung stützen die Theorie, dass L-Arginin eine schützende Wirkung vor Radikalschäden besitzt. Ein direkter Einfluss auf die MPO konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die MPO stieg in Folge der Belastung im Herzen beider Gruppen signifikant an und zeigte keine Veränderung durch die Argininsgabe (Lin et al., 2006).

Eine orale Gabe von Methylprednisolon führte beim Menschen ebenfalls nicht zu einer veränderten MPO-Freisetzung nach körperlicher Belastung. Bereits in Ruhe zeigte sich nach Methylprednisolongabe ein Anstieg der Neutrophilen, der wahrscheinlich auf einer kortisonbedingten Leukozyten-Freisetzung aus dem Knochenmark beruhte. Diese Leukozytose in Ruhe hatte jedoch keinen Einfluss auf die signifikante MPO-Freisetzung nach Belastung, die unbeeinflusst von der Methylprednisolongabe erfolgte (Camus et al., 1993 a). Die Menge der MPO im Blut lag 20 Minuten nach Belastungsende wieder im Ruhebereich (Camus et al., 1993 a).

Einen gewebeabhängigen Unterschied der MPO-Aktivität nach Östrogenbehandlung wiesen Tiidus et al. nach. Sie untersuchten den Einfluss des Hormons auf die Gewebeaktivität der MPO nach Belastung im Herzmuskel vergleichend zum Skelettmuskel. Zu diesem Zweck wurden ovariektomierte weibliche Ratten mit Placebos oder mit Östrogenpellets gefüttert. Im Herzmuskel der östrogensupplementierten Ratten stieg die MPO-Aktivität eine Stunde nach Belastung im Vergleich zu den Ruhewerten signifikant an, während die MPO-Aktivität in der Skelettmuskulatur im Vergleich mit Kontrolltieren zu diesem Zeitpunkt herabgesetzt war.

Dies weist auf eine verstärkte neutrophile Infiltration in die Herzmuskulatur unter Östrogeneinfluss hin. Demnach führt Östrogen zu einer Erhöhung der kardialen MPO-Aktivität bei ovariektomierten Ratten mit besonders hohem Östrogenspiegel. Da Östrogen die Regeneration des nativen MPO-Komplexes fördert, unterstützt sie auf diese Weise auch das Vorhandensein reaktionsfähiger MPO.

Im Gegensatz dazu fanden Raj und Kollegen (1998) sowohl in der quergestreiften Skelettmuskulatur, als auch in der Herzmuskulatur eine signifikant positive Korrelation der Calpainaktivität und der MPO nach Belastung. Beim Calpain handelt es sich um eine kalzium-aktivierte, neutrale Protease des Cysteins, die nach Belastung eine Aktivitätszunahme zeigt, da sie durch belastungsinduzierte Veränderungen des intrazellulären Kalziumspiegels aktiviert wird.

Demnach führt Östrogen zu einer Erhöhung der kardialen MPO-Aktivität bei ovariektomierten Ratten mit besonders hohem Östrogenspiegel, während gleichzeitig die kardiale Calpainaktivität unterdrückt wird (Tiidus et al., 2002). Durch eine spezifische Hemmung der Protease ließ sich auch die MPO-Aktivität und Akkumulation der Granulozyten deutlich vermindern. Daher schließen die Autoren, dass es eine ursächliche Verbindung zwischen Calpainaktivität und Leukozyten-Aktivierung, sowie MPO-Aktivität geben könnte. Sie führen dies auf die Entstehung von chemotaktisch aktiven Peptiden durch die neutrale Protease zurück, die eine Aktivierung der neutrophilen Granulozyten bedingen könnte (Raj, Booker & Belcastro, 1998).

Bei *in vitro* Versuchen von Nguyen und Kollegen (2005) wurden Monolayer von Muskelzellen zweier Mäusepopulationen (MPO-knockout-Mäuse und Wildtyp-Mäuse) über einen Zeitraum von 24 Stunden immer wieder einem mechanischen Stress im physiologischen Bereich ausgesetzt.

Es zeigte sich, dass die Zytotoxizität der Leukozyten bei beiden Mäusepopulationen ähnlich hochsignifikant ansteigt, wenn die Leukozyten zu belasteten Muskelzellen gegeben werden. Nguyen und Kollegen führten diese Versuche ohne und nach Zugabe von Superoxid-

Dismutase (SOD) durch. Die SOD ist ein zelleigenes, antioxidatives Enzym. Sie katalysiert die Reaktion der Superoxidradikale zu dem weniger reaktiven  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Für die MPO ist das Vorhandensein der SOD wesentlich, da sie nur unter  $\text{H}_2\text{O}_2$  Anwesenheit HOCL produzieren kann (Klebanoff, 1999). Die Zytotoxizität der Leukozyten in beiden Mäusepopulationen wies unter Abwesenheit von SOD nach Belastung keinen signifikanten Unterschied auf. Nach Zugabe von SOD, zeigten die Zellkulturen der Wildtyp-Mäuse einen deutlichen Anstieg der Zellyse nach Belastung (über 70 %ige Zunahme).

Die Zellen der MPO-null-Mäuse zeigten unter gleichen Bedingungen keine signifikante Erhöhung der Zellyse nach Belastung. Diese Resultate belegen deutlich, dass mechanische Belastung von Muskelzellen unter Anwesenheit von Leukozyten und SOD zu einer MPO-vermittelten Gewebeschädigung führt (Nguyen, Lusic & Tidball, 2005).

Ob die Belastungsintensität einen größeren Einfluss auf die MPO hat, als der totale Energieaufwand, wurde beim Pferd anhand einer langen Belastung (9-11 Stunden) in moderater Geschwindigkeit, mit den Auswirkungen einer kurzen hohen Belastung (6-7 Minuten) untersucht. Nach einer hohen Belastungsintensität kam es zu einem signifikanten Anstieg der MPO-Menge im Blut, der nicht mit dem Anstieg der anderen gemessenen Parameter (Laktat, Leukozyten, CK) korrelierte. Die signifikante Erhöhung der MPO erfolgte ohne eine Leukozytose. Eine positive Korrelation zwischen dem signifikanten Anstieg der MPO, der CK und der Leukozytose, war im Gegensatz dazu, nach der Ausdauerbelastung vorhanden (Art et al., 2006 b). Es wurden in dieser Untersuchung beim Pferd keine Aussagen über oxidative Schäden, oder mögliche Aktivitätsveränderungen der MPO gemacht.

Die Variabilität der bisherigen Ergebnisse lässt den Schluss zu, dass der Grad der belastungsbedingten Entzündungsantwort durch eine Reihe von Faktoren deutlich beeinflusst wird. Hier sind Trainingszustand, Belastungsdauer und -intensität (Quindry et al., 2003), Art der Belastung (isotonische Muskelarbeit im Vergleich zur isometrischen) (Camus et al., 1993 b), Alter, Ernährung, immunologischer (Danell Schwindt, Zaldivart & Cooper, 2008) und hormoneller (Tiidus et al., 2002) Status der Individuen zu nennen. Auch unterschiedliches Probenmaterial kann zu deutlich unterschiedlichen Ergebnissen führen (Shih et al., 2008).

## 2.2.4 Beteiligung am oxidativen Stress

In einer aktuellen Studie von Ceusters und Kollegen (2012) konnten Myoblasten von Pferden kultiviert, und ihre ROS-Produktion nach Anoxie und Reoxygenierung gemessen werden. Die Zellen zeigten eine um 71% gesteigerte ROS-Produktion im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Die Zugabe von MPO führte sogar zu einer Steigerung auf 183%. Unter Anwesenheit von Meerrettichperoxidase war die Steigerung mit 228% am größten (Ceusters et al., 2012).

Neben dem Einfluss der MPO auf die ROS-Produktion von Zellen kann die MPO auch direkt über ihr Reaktionsprodukt (hypochlorige Säure) zum oxidativen Stress beitragen.

Hypochlorige Säure ist ein starkes Oxidans und wirkt toxisch auf Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen und Helminthen. Aus diesem Grund ist sie Teil der körpereigenen Immunzellen, die dem Schutz vor Infektionen dienen (Gaut et al., 2001). Ihre Toxizität wirkt allerdings unspezifisch und lässt sie zur Gefahr für körpereigene Strukturen werden (Nguyen, Lusic & Tidball, 2005).

Hypochlorige Säure reagiert mit einer Vielzahl oxidierbarer Biomoleküle, die ungesättigte Doppelbindungen, Thiole oder Stickstoffkomponenten enthalten. Die wesentlichen Chlorierungsreaktionen finden mit Pyridinnukleotiden (zum Beispiel  $\text{NAD}^+$ ), Cholesterol und ungesättigten Fettsäuren unter Bildung von Chlorhydrinen und mit Aminogruppen unter Bildung von Chloraminen statt. Die schwache Säure ( $\text{pK}_a = 7,5$ ) zeigt neben ihrer allgemein

oxidierenden Wirkung besonders gegenüber aromatischen Seitenkette eine große Reaktivität: die Reaktion mit Tyrosin führt zu unterschiedlichen Chloro-Derivaten, vor allem zu 3-Chlorotyrosin. Durch die Addition an Doppelbindungen in Lipiden kommt es zu Bildung von Chlorhydrinen, die Reaktion mit primären Aminen führt zu Chloraminen. In Gegenwart geeigneter Elektronen-Donatoren wie zum Beispiel Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) kommt es zur Bildung von Hydroxyl-Radikalen ( $\text{OH}^\cdot$ ) und reduziertem Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Wei, Hong & Kui, 2005).

Darüber hinaus ist HOCL in der Lage, Membranen zu durchqueren (Albrich, McCarthy & Hurst, 1981).

Die Reaktion der HOCL erfolgt bereitwillig mit den Aminosäureseitenketten von Proteinen (besonders mit Cystein, Tyrosin, Methionin, Histidin, Lysin und Tryptophan) und führt zu deren Chlorinierung. Das Chlor der HOCL spaltet dabei ein Wasserstoffatom ab, was zur Bildung eines organischen Chloramins führt. Chlorinierte Aminosäuren zerfallen rasch, aber Proteinchloramine sind stabiler und besitzen selbst oxidative Kapazität (Winterbourn, 1985). Thomas et al. stellten fest, dass die meisten organischen Chloramine durch interne Neuordnung zerfielen und dass wenig verfügbare  $\text{NH}_2$ -Gruppen den Angriff auf die Peptidbindung fördern, die zur Spaltung der Proteine führte (Thomas, 1979). McKenna und Davies ermittelten, dass eine Konzentration von 10 mM, oder mehr HOCL notwendig ist, um Proteine *in vivo* zu fragmentieren. Später wurde die These entwickelt, dass das Chloramin einer molekularen Neuordnung unterliegt, wodurch HCl und Ammoniak freigesetzt werden, und ein Amid bilden. Die Amidgruppe kann weiter mit einer anderen Aminogruppe reagieren, um Schiff-Basen zu bilden, oder strukturelle Änderungen und Aggregation von Proteinen zu verursachen (McKenna & Davies, 1988; Davis, 1987).

Es ist bekannt, dass HOCL zu posttranslatorischen Veränderungen von Proteinen führt. In erster Linie kommt es zur Oxidation von Cystein und Methionin. Eine Untersuchung der bakteriziden Eigenschaften der HOCL zeigt, dass sie ein starker Induktor für Proteinaggregation ist. Hsp33, ein Hitzeschockprotein, von dem bekannt ist, dass es durch oxidativen Hitzestress aktiviert wird, schützt Bakterien vor der Einwirkung von HOCL, indem es wirksam die Proteinaggregation verhindert. Mutationen von *Escherichia coli* und *Vibrio cholerae*, denen Hsp33 fehlte, zeigten sich in Bezug auf HOCL besonders empfindlich. Hsp33 schützte viele essentielle Aminosäuren vor Inaktivierung und Proteinaggregation. Die Inaktivierungs- und Aggregationsinduktion ist ein wahrscheinlicher Vermittler der bakteriziden Wirkungen von HOCL (Winter et al., 2008).

Die HOCL reagiert auch mit ungesättigten Doppelbindungen in Lipiden. Die Reaktion geschieht durch Hydrolyse und zum einem durch Bindung des Chlors an ein Kohlenstoffatom, und zum anderen durch Bindung einer Hydroxylgruppe an ein Kohlenstoffatom auf. Die entstehende Verbindung ist ein Chlorhydrin. Das polare Chlorin zerstört Lipiddoppelschichten und steigert die Durchlässigkeit von Lipidmembranen (Carr, Berg & Winterbourn, 1996). Wenn Chlorhydrin-Produktion in Lipiddoppelschichten der Erythrozyten auftritt, zeigen die Zellen gesteigerte Membranpermeabilität. Eine Zerstörung kann auftreten, wenn genug Chlorhydrin gebildet wird. Der Zusatz von vorgeformtem Chlorhydrin zu roten Blutzellen (RBB) beeinflusst auch *ex vivo* deren Durchlässigkeit (Vissers et al., 1994).

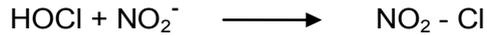
Hypochlorsäure kann durch die Reaktion mit einem Superoxidanion-Radikal ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) in ein Hydroxyl-Radikal überführt werden (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7: Reaktion der Hypochlorsäure mit einem Superoxidanion-Radikal**

Durch diese Reaktion können OH-Radikale durch HOCL über weitere Distanzen verbracht werden, als sie alleine diffundieren könnten.

Abbildung 8 zeigt ein Zusammentreffen von einem Nitrit-Anion mit einem Molekül HOCL, wobei das sehr reaktive Nitrylchlorid ( $\text{Cl-NO}_2$ ) entsteht (Eiserich et al., 1998).



**Abbildung 8: Reaktion der Hypochlorsäure mit einem Nitrit-Anion**

Auf diese Weise besteht die Möglichkeit, dass aus HOCL weitere reaktive Oxidantien, wie Hydroxylradikale, Singulett-Sauerstoff, oder (bei einem Überschuss an  $\text{Cl}^-$ ) auch molekulares Chlor hervorgehen.

Die Reaktionsfreudigkeit der HOCL mit Nukleinsäuren ist vergleichsweise gering (Dennis, Olivieri & Krusé, 1979).

## 2.3 Reaktive Sauerstoffmoleküle unter physischer Belastung

### 2.3.1 Entstehung von reaktiven Molekülen unter Belastung

Definitionsgemäß bezeichnet man Moleküle, die ein ungepaartes Elektron besitzen und daher in der Lage sind, andere Moleküle zu oxidieren, als freie Radikale. Kennzeichnend für die freien Radikale ist ihre hohe Reaktivität, die im Organismus zu Gewebeschäden führt (Judge & Dott, 2004).

Man unterscheidet biochemisch zwei große Gruppen von Radikalen. Zum einen die sogenannten ROS (engl. *reactive oxygen species*), die sich von molekularem Sauerstoff ableiten, zum anderen die reaktiven Stickstoffverbindungen (RNS; engl. *reactive nitrogen species*), die sich von NO ableiten. Von den RNS ist vor allem das Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) von Bedeutung (Davies et al., 1982; Ji, 1999).

Innerhalb der ROS werden die „echten“, also radikalischen Substanzen, von den reaktiven Sauerstoffverbindungen ohne ein freies Radikal unterschieden. Auch reaktive Sauerstoffverbindungen, wie die HOCL, oder  $\text{H}_2\text{O}_2$  sind oxidativ wirkende Substanzen und werden zur Gruppe der ROS gezählt.

Die vermehrte Entstehung von ROS durch physische Belastung ist mittlerweile eine ausreichend nachgewiesene Tatsache (Brady, Ku & Uilrey, 1978; Avellini, Silvestrelli & Gaiti, 1995; Donovan et al., 2007).

Auf biochemischer Ebene existieren mehrere Ursprungsmöglichkeiten für freie Radikale (Soffler, 2007; Ji, 1999; Powers & Jackson, 2008).

Die Mehrzahl der Untersuchungen sieht in der unvollständigen Reduktion des molekularen Sauerstoffes während der Atmungskette an der Mitochondrienmembran die Hauptquelle der ROS (Avellini, Chiardia & Gaiti, 1999; Kinnunen et al., 2005 b; De Moffarts, 2005; Chance, Sies & Boveris, 1979). In Ruhe werden hier etwa 2 % des Sauerstoffes durch unvollständige Elektronenübertragung zu freien Radikalen (Superoxidanion,  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder Hydroxylradikal) (Chance, Sies & Boveris, 1979).

Unter Belastung erhöht sich der Sauerstoffumsatz der Muskulatur um ein Vielfaches. Je größer das Tier ist, desto stärker kann es seinen Sauerstoffumsatz bei Bedarf steigern. Das Pferd liegt hier mit einer 30-fachen Steigerung seines Grundumsatzes zusammen mit dem Kamel an der Spitze (Engelhardt, 2000). Die Frage, ob ein gesteigerter  $\text{O}_2$ -Umsatz der arbeitenden Zellen grundsätzlich einer Erhöhung der oxidativen Schäden einhergeht, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt (Di Meo & Venditti, 2001; Shi et al., 2007). Abbildung 9 zeigt eine Übersicht über Bildungswege (durchgezogene Pfeile) und einige Eliminationsmechanismen (unterbrochene Pfeile) von ausgewählten Sauerstoffradikalen.

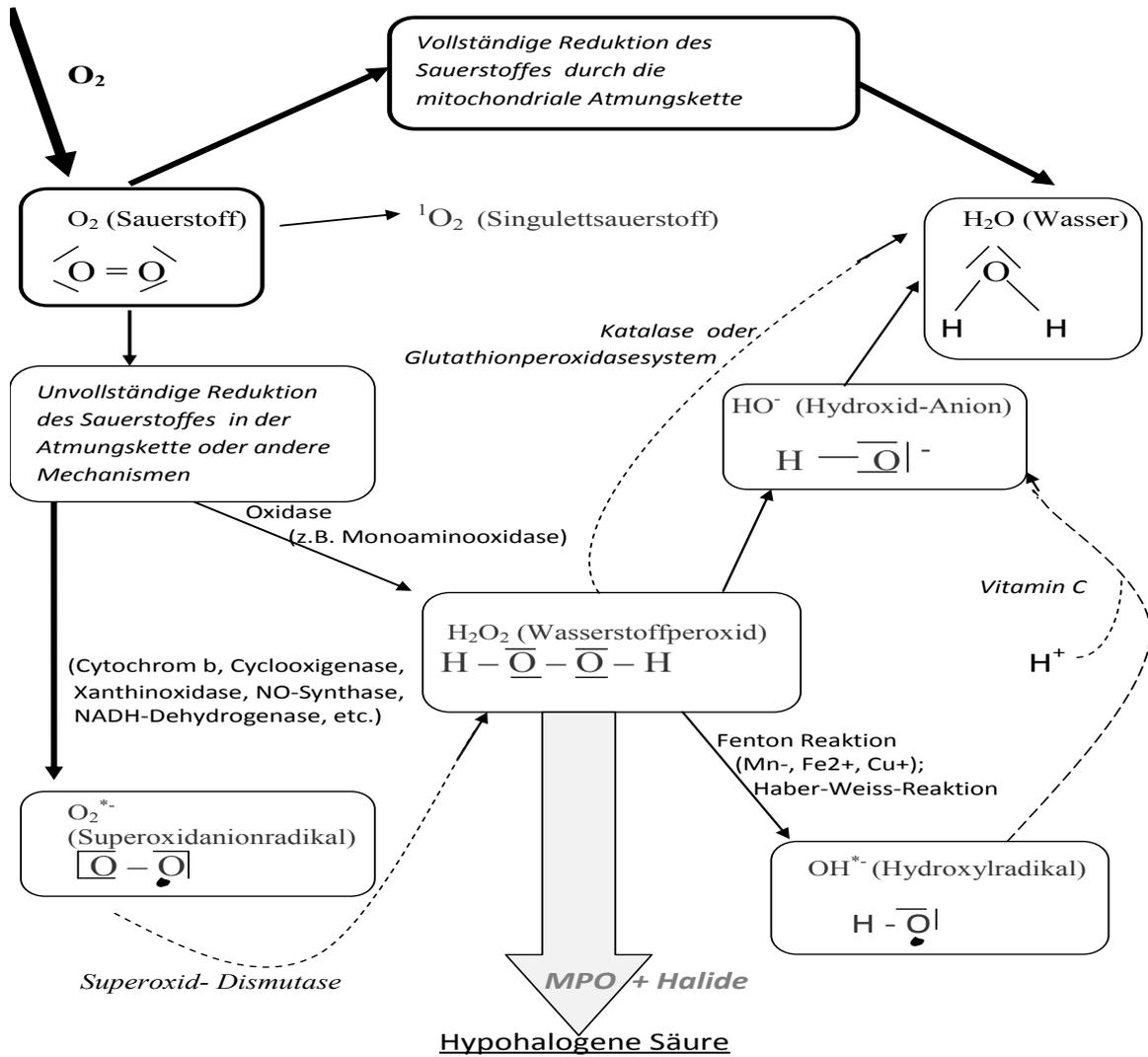


Abbildung 9: Sauerstoff und Bildung von freien Radikalen. Modifiziert nach De Moffarts und Kollegen, 2005.

Unterstützt wird die Annahme, dass die Atmungskettenreaktion mit der ROS-Produktion unter Belastung verbunden ist, durch den Nachweis von deutlichen oxidativen Schäden an Mitochondrien, sowohl im Skelettmuskel, als auch in Lebergewebe und Herzmuskulatur (Davies et al., 1982). Wenn Metallionen als Katalysator vorhanden sind, werden durch die eisen-katalysierte Haber-Weiss-Reaktion (siehe Abbildung 10) hochreaktive Hydroxylradikale gebildet (Kappus, 1981; Koppenol, 2001).

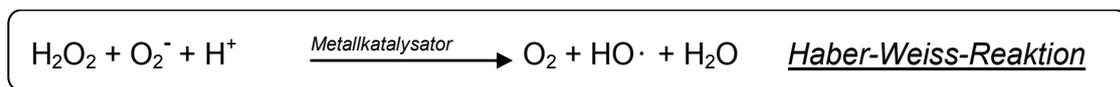


Abbildung 10: Haber-Weiss-Reaktion

Die Bildung von Hydroxylradikalen kann in Gegenwart von Eisen als Katalysator durch die Fenton-Reaktion (unter Anwesenheit von Eisen) erfolgen:

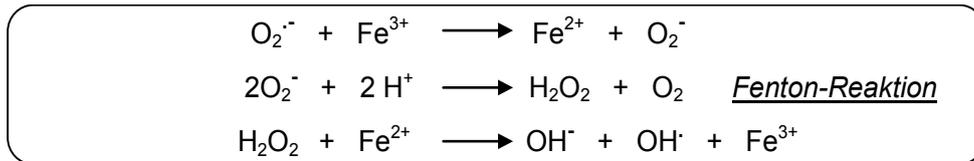


Abbildung 11: Fenton-Reaktion

Andere Metalle, zum Beispiel Kupfer, sind ebenfalls in der Lage diese Reaktion zu katalysieren. Hydroxylradikale können auch entstehen, wenn Semichinonradikale mit Wasserstoffsuperoxid reagieren. In diesem Fall sind Metallkatalysatoren nicht notwendig.

Dennoch werden freiwerdendem Myoglobin und Hämoglobin schädigende, oxidative Eigenschaften zugesprochen. Besonders während einer akuten Rhabdomyolyse, wie dem „tying up“, werden große Mengen Myoglobin frei. Der Artikel von Reeder und Wilson befasst sich ausführlich mit dem Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und eisenhaltigen Molekülen (Reeders & Wilson, 2005).

Als zweite ROS-Quelle ist die zelleigene NADPH-Oxidase der neutrophilen Granulozyten selbst zu nennen (Klebanoff, 2005). Die Leukozytose stellt eine der frühesten systemischen Reaktionen des Organismus auf Belastung dar. Obwohl die Frage nach den genauen Aktivierungsmechanismen der Leukozyten ungewiss ist, tragen die aktivierten neutrophilen Granulozyten maßgeblich zur Generierung von echten freien Radikalen und reaktiven Sauerstoffverbindungen bei. Die Aktivierung der NADPH-Oxidase führt zur Bildung von ROS und ist Grundbestandteil des „respiratory burst“. Einer Reihe von Substanzen werden in diesem Zusammenhang aktivierende Eigenschaften zugeschrieben. Hier sind zum einen belastungsbedingt freigesetzte Katecholamine zu nennen, zum anderen mechanische Zellschäden, Endotoxämie als Folge der Belastung (Baker et al., 1988), die ROS, die MPO selbst (Klinke, 2009), Zytokine oder andere chemotaktische Substanzen (Philippou et al., 2009).

Auf diese Weise bewirkt enzymatische MPO-Aktivität, durch Bildung von HOCl, dass Membranlipide oxidiert werden, Tyrosin-Reste von Proteinen reaktiv werden und cholesterinreiche Lipoproteine oxidiert werden (Woods, Linton & Davies, 2003). Andere Peroxidasen innerhalb der Lysosomen werden gleichzeitig frei und entfalten ebenfalls ihre oxidative Aktivität.

Eine dritte Möglichkeit ROS zu produzieren geht von dem Enzym Xanthindehydrogenase nach Umwandlung in die XO aus. Die XO gehört zu den  $\text{H}_2\text{O}_2$  generierenden Enzymen (Klebanoff, 2005) und katalysiert den Abbau von Hypoxanthin zu Harnsäure. Dabei produziert sie das Superoxidanion, das durch die SOD oder spontane Dismutation in  $\text{H}_2\text{O}_2$  überführt wird, wodurch bei Reperfusion ROS entstehen. Die XO wird als eine ROS-Quelle beim Ischämie-Reperfusionsschaden beschrieben (Judge & Dott, 2004). Unter Hypoxie kommt es zum anaeroben Stoffwechsel innerhalb der Zelle und zu gestörter ATP-Synthese, was zu einer Zellermüdung und einer Akkumulation von Stoffwechselmetaboliten (zum Beispiel Hypoxanthin) innerhalb der Zelle führt. Aufgrund des ATP-Verbrauches, kommt es zu einer Verringerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-Aktivität und durch den daraufhin ansteigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel in der Zelle zur Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Proteasen, die die Umwandlung der Xanthindehydrogenase zu XO verursachen (Zuo, 2005).

Im Verlauf der Reoxygenation erfolgt dann (durch die XO) die Bildung von Harnsäure aus Hypoxanthin, dabei entsteht als Zwischenstufe Xanthin und durch direkte Elektronenübertragung Sauerstoffradikale. Sowohl erhöhte Hypoxanthin-, Xanthin-, als auch Harnsäurewerte wurden bei Rennpferden nach intensiver Belastung festgestellt (Mills et al., 1996). Unter maximaler Belastung (bei einer Geschwindigkeit von über 10 m/s) konnten Wagner und Kollegen bei Rennpferden einen überproportionalen Anstieg des arteriellen  $\text{PCO}_2$ -Wertes und einen Abfall des  $\text{PO}_2$ -Wertes nachweisen. Solch ein Zustand begünstigt das Entstehen einer hypoxischen Situation im Gewebe (Wagner, 1989).

Die tatsächliche Bedeutung dieses Mechanismus bei der ROS-Produktion unter Belastung ist jedoch beim Pferd in vivo unklar, da das Pferd in besonderer Weise zur Steigerung der Sauerstofftransportkapazität des Blutes unter Belastung fähig ist, und die nachgewiesenen Veränderungen von den Autoren als nicht gravierend beschrieben werden (Engelhardt, 2000).

Die Entstehung der freien Radikale sollte im Organismus im Gleichgewicht mit ihrer Elimination stehen. Aus diesem Grund verfügt der Körper über ein komplexes antioxidatives Schutzsystem dessen Aufgabe darin besteht, die Radikalproduktion zu verringern, oder entstandene Radikale unschädlich zu machen. Zu diesen Mechanismen zählen enzymatische (zum Beispiel Glutathion-Peroxidase, Katalase, SOD) oder nicht-enzymatische (wie zum Beispiel Vitamin C,  $\alpha$ -Tocopherol, Glutathion, etc.) Antioxidantien (Abbildung 9, unterbrochene Pfeile). Das Vorhandensein dieser Stoffe und ihr Einfluss auf die Bildung und schädigende Wirkung von freien Radikalen nach Belastung ist Gegenstand aktueller Forschung besonders im Bereich des Pferdeleistungssportes (De Moffarts, 2005; Brincker, 2004; Williams et al., 2004).

Aufgrund ihrer hohen Reaktivität sind freie Radikale und reaktive Sauerstoffsubstanzen eine potentielle Gefahr für alle körpereigenen Moleküle, wie Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA), Lipide, Proteine, Kohlenhydrate und Cholesterole. Die Folgen solcher Radikalangriffe können vielfältig sein, je nachdem, welche Moleküle primär betroffen sind, und wie groß die Schädigung ist. Proteine können ihre biologische Aktivität verlieren und zur Formation weiterer reaktiver Substanzen beitragen (Woods, Linton & Davies, 2003). Lipidoxidation resultiert unter anderem in Membranschäden bis hin zur Zellyse oder zur Veränderung zirkulierender lipidreicher Moleküle (zum Beispiel Lipoproteine). Eine oxidative Schädigung der DNA kann sich in Strangbrüchen und Apoptose der Zellen äußern (Di Meo & Venditti, 2001; Bindoli, Rigobello & Deebale, 1992). Faktoren, die das Ausmaß der Schädigungen beeinflussen, sind:

- Die Konzentration von Radikalen und Zielmolekülen
- Die Lebensdauer der Radikale
- Die grundsätzliche Reaktionsrate der beiden Stoffe miteinander
- Die Lokalisation von Radikalen und Zielmolekülen (intrazellulär, extrazellulär oder organspezifisch)
- Das Vorhandensein von antioxidativen Schutzmechanismen

Obwohl besonders hochreaktive Moleküle deutlich unselektiver reagieren, können weniger reaktive Moleküle durch ihre längere Lebensdauer unter Umständen schädlicher wirken.

### **2.3.2 Schäden durch freie Radikale**

Als oxidativen Stress bezeichnet man definitionsgemäß das Auftreten von oxidativen Schäden aufgrund freier Radikale oder reaktiver Spezies im Organismus. Diese können bedingt sein durch eine verstärkte Radikalproduktion, und/oder auf einer Abnahme der antioxidativen Kapazität beruhen (Kirschvink, de Moffarts & Lekeux, 2008). Durch körperliche Belastung entstehen vermehrt ROS, deren Quantität von der Dauer und Intensität der Belastung abhängt. Bei starker körperlicher Belastung steigen Marker für oxidative Schäden signifikant an, so zum Beispiel MDA und reduziertes Glutathion bei Rennpferdehengsten (Chiardia et al., 1998).

Grundsätzlich konnten in zahlreichen Versuchen bei allen Spezies oxidative Schäden oder Veränderungen im antioxidativen Status im Zusammenhang mit Belastung belegt werden. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über diesbezügliche Untersuchungen beim Pferd.

Auch wenn das Vorliegen von belastungsbedingtem oxidativen Stress ausreichend nachgewiesen wurde, gibt es keine einheitliche Meinung über die genauen Entstehungsmechanismen. Aufgrund der Kurzlebigkeit der ROS selbst und der Fülle von

möglichen Reaktionsmechanismen, konnte bislang die Hauptursache der Schäden noch nicht identifiziert werden (Deaton & Marlin, 2003).

**Tabelle 1: Untersuchungen zu oxidativem Stress unter Belastung beim Pferd**

<b>Belastung</b>	<b>Parameter / (Probenmaterial)</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>Probenentnahme</b>	<b>Literatur</b>
Training	Malondialdehyd ( <b>MDA</b> ) (Erythrozyten)	erhöht	1. Probe: Vor Beginn 2. Probe: Nach Ende	(Brady, Ku, & Uilrey, 1978)
Laufband	Lipidperoxide ( <b>LPO</b> ) Hypoxanthin (Plasma)	Beide erhöht	1. Probe: Vor Beginn 2. Probe: Nach Ende	(Mills, Smith, Casas, Harris, & Marlin, 1996)
Rennpferde: Nach 3 Monaten Training eine kurze Belastung mit höherer Intensität	<b>MDA</b> reduziertes Glutathion ( <b>GSH</b> ) CK und LDH (Serum und Plasma)	<b>GSH</b> und <b>MDA</b> direkt nachher erhöht, <b>MDA</b> auch nach 18 Stunden (h) noch. Keine signifikante Erhöhung der CK und LDH.	1. Probe: Vor Beginn 2. Probe: Nach Ende 3. Probe: 18 h nach Ende	(Chiardia, et al., 1998)
11 Vollblüter Belastungstest auf der Bahn	Thiobarbitursäure reaktive Substanzen ( <b>TBARS</b> ) ( <i>Serum</i> ) Antioxidative Kapazität (Plasma)	<b>TBARS</b> und die <b>antioxidative Kapazität</b> des Plasmas signifikant erhöht nach Belastung.	1. Probe: Vor Beginn 2. Probe: 5 min nach Ende	(Avellini, Chiardia, & Gaiti, Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some radical scavengers in horses, 1999)
5 Pferde Distanzrennen über 160 km	Totaler antioxidativer Status ( <i>Plasma</i> ) Aktivität der Glutathion-Peroxidase ( <b>GPx</b> ) Superoxid-dismutase ( <b>SOD</b> ) (Vollblut) <b>TBARS</b> (Serum)	Totaler antioxidativer Status erniedrigt nach 60 km. Erhöhte <b>GPx</b> im Vollblut zur gleichen Zeit. In Probe 3 erhöhte <b>SOD</b> und <b>TBARS</b> .	1. Probe: Vor Beginn 2. Probe: Nach 60 km 3. Probe: Nach Ende	(Frankiewicz-Jozko & Szarska, Antioxidant level to exercise in the blood of endurance horses, 2000)
14 Sportpferde Springen	<b>TBARS</b> (Plasma) <b>GSH</b> (in den roten Blutzellen; RBB)	<b>TBARS</b> nach 24 h unter dem Ausgangswert. <b>GSH</b> nach 24 h noch signifikant erhöht.	1. Probe: Vor Beginn 2. Probe: 5 min nach Ende 3. Probe: 24 h nach Ende	(Balogh, Gaal, Ribiczeyne, & Petri, 2001)

Belastung	Parameter / (Probenmaterial)	Ergebnisse	Probenentnahme	Literatur
30 Vollblüter Laufbelastung auf der Bahn	<b>TBARS</b> Antioxidative Kapazität Antioxidative Reaktivität (Plasma)	Signifikante Erhöhung <b>aller drei</b> Werte 5 min nach Belastungsende.	1. Probe: Vor Beginn 2. Probe: 5 min nach Ende	(White, et al., 2001)
40 Pferde Distanzrennen über 140 km	<b>GSH</b> <b>TBARS</b> CK und AST Vitamin C Vitamin E (Serum und Plasma)	<b>GSH</b> signif. Reduziert; <b>TBARS</b> nach Belastung erhöht. CK u. AST direkt nach dem Rennen erhöht. Vit. C und nach 16 h signifikant reduziert. Vit. E unverändert.	1. Probe: Vor Beginn 2. Probe: Nach Ende 3. Probe: 16 h nach Ende	(Marlin, et al., 2002)
46 trainierte Distanzpferde, die einen 80 km Lauf absolviert haben.  1. Gruppe mit Vit. E Supplementierung.  2. Gruppe mit Vit.E und Vit. C Supplementierung	totales Glutathion ( <b>T-GSH</b> ) Aktivität der Glutathionperoxidase ( <b>GPx</b> ) (in Lysaten der roten und weißen Blutzellen)  <b>LPO</b> (Plasma) CK und AST Albumin $\alpha$ -Tocopherol Ascorbinsäure (total und im Plasma)	Die Ascorbinsäure im Plasma war in der 1. Gruppe um 18 % gegenüber der 2. Gruppe erhöht in Probe 1. CK und AST stiegen während der Belastung an. Beide korrelierten mit dem signifikanten Anstieg der <b>LPO</b> im Plasma. $\alpha$ -Tocopherol bis zu km 56 erhöht. <b>T-GSH</b> erhöht in den weißen Blutzellen. Die <b>GPx</b> war erhöht in der Erholungsphase. <b>T-GSH</b> und <b>GPx</b> in den RBB bis km 56 erniedrigt.	1. Probe: 1 Tag vorher 2. Probe: Nach 21 km 3. Probe: Nach 37 km 4. Probe: Nach 56 km 5. Probe: Nach 72 km 6. Probe: Nach 80 km 7. Probe: In der Erholungsphase	(Williams, et al., Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race, 2004)

Belastung	Parameter / (Probenmaterial)	Ergebnisse	Probenentnahme	Literatur
8 Traber: Moderate Laufbandbelastung (45 min)	<b>Carbonylierte Proteine</b> Hitzeschockproteine (HSP70, HSP90, HSP75)  (Plasma)  -Muskelbiopsie der Glutealmuskulatur vorher und 4 h nachher (Gewebe)	Signifikanter Anstieg der <b>carbonylierten Proteine</b> im Plasma nach Belastung (über 24 h). Signifikanter Anstieg auch im Muskel nach 4 h. Hitzeschockproteine in der Muskulatur unverändert.	1. Probe: Vor Beginn 2. Probe: Nach Ende 3. Probe: 4 h nach Ende 4. Probe: 24 h nach Ende	(Kinnunen, et al., 2005 a)
8 Traber: Nach regelmäßigem Training auf dem Laufband eine 53 min lange Einheit moderates Training	Die antioxidative Kapazität: ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) Vitamin E T-GSH <b>LPO</b> -Muskelbiopsie der Glutealmuskulatur vorher und 4 h nachher (Gewebe)	ORAC in Probe 2 signifikant erhöht (über Zeitraum von 24 h). Auch die <b>LPO</b> sind in Probe 2 signifikant erhöht. Die Basiswerte der ORAC korrelierten negativ mit den <b>LPO</b> in Probe 3. Das totale Glutathion und Vit. E waren unverändert.	1. Probe: Vor Beginn 2. Probe: Nach Ende 3. Probe: 4 h nach Ende 4. Probe: 24 h nach Ende	(Kinnunen, et al., 2005 b)
Pferden, die einen 80 km Ritt nicht beenden konnten (NF), im Vergleich zu den Tieren, die ihn erfolgreich beendet haben (F).	<b>LPO</b> $\alpha$ -Tocopherol CK und AST <b>T-GSH</b> GPx  (Serum und Plasma)	Aktivität von CK und AST während und nach Belastung signifikant erhöht (bei NF). <b>LPO, T-GSH, GPx, <math>\alpha</math>-Tocopherol</b> nichtsignifikant verändert (bei F). Es wurde eine positiv signifikante Korrelation zw. <b>T-GSH</b> und CK festgestellt.	1. Probe: Vor Beginn 2. Probe: Nach 27 km 3. Probe: Nach 48 km 4. Probe: Nach 80 km 5. Probe: 170-190 min nach Ende	(Williams, et al., Comparison of oxidative stress and antioxidant status in endurance horses in three 80-km races, 2005)

Belastung	Parameter / (Probenmaterial)	Ergebnisse	Probenentnahme	Literatur
12 Sportpferde Laufbelastung auf der Bahn	Antioxidative Kapazität der wasserlöslichen Substanzen (Plasma) <b>LPO</b> (Plasma) <b>GSH</b> (reduziertes Glutathion) (rote Blutzellen) <b>Oxidierter Proteine</b> (Plasma)	Zunahme der <b>antioxidativen Plasmakapazität</b> nach der Belastung. Signifikant erhöhte <b>Lipidperoxide</b> 15 min nach Ende der Belastung. Zunahme der <b>GSH</b> nach Belastung. Erhöhte Werte der <b>oxidierten Proteine</b> über 24 h.	1. Probe: Vor Beginn 2. Probe: 15 min nach Ende 3. Probe: 24 h nach Ende	(De Moffarts, Kirschvink, Art, Pincemail, & Lekeux, 2006)

Es liegen eine Reihe von Untersuchungen beim Pferd vor, die den Einfluss von körperlicher Belastung auf den antioxidativen Status untersuchen (Balogh et al., 2001; Kirschvink et al., 2006). Dabei wurde grundlegend festgestellt, dass es im antioxidativen System durch Training langfristig eher zu einer Erhöhung wichtiger antioxidativer Substanzen (Vit. C, Harnsäure, GPx und SOD) kommt (Kirschvink, de Moffarts & Lekeux, 2008). Dagegen kann eine Ausdauerbelastung in einer verminderten Schutzwirkung resultieren, wodurch oxidativer Stress entsteht (Frankiewicz-Jozko & Szarska, 2000). Ursache könnte eine „Ermüdung“ oder zunehmende Überbelastung des antioxidativen Systems sein. Bei Pferden während eines 140 km langen Ausdauerittes sanken Vitamin-C-Spiegel und Glutathion zwar erst nach der Belastung ab, erhöhte CK- und AST-Werte wiesen aber bereits während der Belastung auf eine verstärkte Zellschädigung hin (Marlin et al., 2002).

Andere Untersuchungen zeigen dagegen eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität nach akuter, intensiver Belastung (Kinnunen et al., 2005 b; Avellini, Silvestrelli & Gaiti, 1995; White et al., 2001).

#### Lipidperoxidation:

Lipide nehmen im Organismus zahlreiche Aufgaben wahr. Membranen dienen der Abgrenzung von Kompartimenten und dem Schutz des Zellinneren, lassen einen selektiven, gerichteten Stoffaustausch zu oder bilden eigenständige Reaktionsräume (zum Beispiel für die Photosynthese oder die Atmungskette). Lipide spielen aber auch als Energie- und Kohlenstoffspeicher, Isolatoren, Vitamine (A, D, E oder K) und Cofaktoren (Ubichinon), Signalstoffe und Hormone (Prostaglandine) oder Pigmente (Carotinoide) eine wichtige Rolle. Bei der Peroxidation von Lipiden wird formal ein Sauerstoff-Molekül zwischen ein Wasserstoff-Atom und den Molekülrest eingefügt. Die Reaktion verläuft über Radikale.

Die Produkte dieser radikalischen Oxidation führen in Zellmembranen zu massiven Schäden und Funktionseinbußen. Initiiert wird die Lipidperoxidation durch Abspaltung eines H• von einer ungesättigten Fettsäure:



**Abbildung 12: Initiation der Lipidperoxidation**

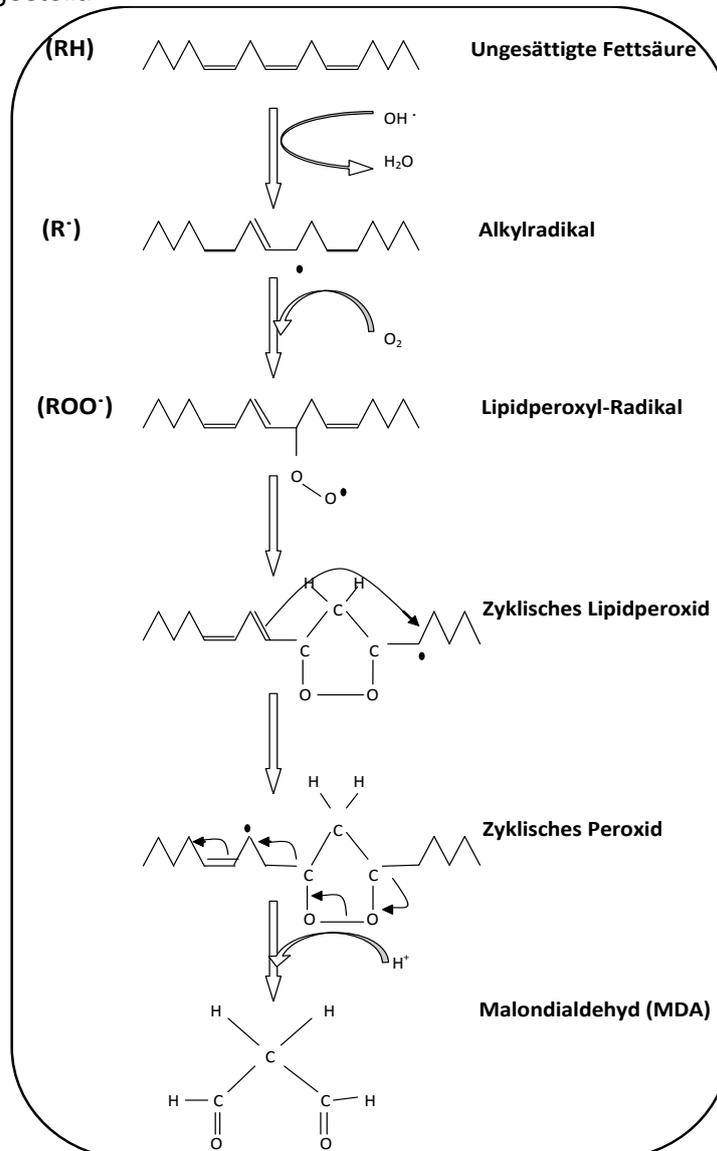
Mit Sauerstoff kann das Lipidradikal reagieren und eine Kettenreaktion in Gang setzen.

Die Reaktionsprodukte sind Lipidmonohydroperoxide. Diese können spontan, durch Erwärmen oder durch Metallkatalysatoren weitere Radikalkettenreaktionen initiieren (Kappus, 1981).

Die Radikalkettenreaktion wird gestoppt, wenn zwei Radikale miteinander reagieren. Unter Anwesenheit von primären Aminogruppen können Schiffsche Basen und substituierte Pyridinderivate mit MDA entstehen.

Zu den messbaren Endprodukten dieser Kettenreaktion gehört neben Ethan und n-Pentan auch MDA (Leaf et al., 1997). Damit MDA entstehen kann, müssen mindestens drei isolierte Doppelbindungen im Lipid vorliegen (Kappus, 1981). Malondialdehyd und andere Lipidperoxidationsprodukte können *in vivo* mit DNA reagieren, was zu Quervernetzungen der DNA-Stränge führen kann (Gutteridge & Toeg, 1982). Das MDA neigt zur Polymerisation wobei ein fluoreszierendes Polymer entsteht.

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, eignet sich das MDA als Indikator für oxidative Lipidschäden durch Radikale. Die Oxidation einer mehrfach ungesättigten Fettsäure zu MDA ist in Abbildung 13 dargestellt.



**Abbildung 13: Entstehung von Malondialdehyd durch Radikalangriff.**  
Modifiziert nach Hall & Bosken, 2009.

Boffi und Kollegen (2002) haben festgestellt, dass es beim Sportpferd durch Belastung zu einer vermehrten Apoptose der Muskelzellen kommt. Sie fanden gleichzeitig einen

signifikanten Anstieg des MDA 45 Minuten nach Belastung. Als mögliche Ursachen führen sie neben ionisiertem Kalzium die ROS an, die zu oxidativen Lipidschäden geführt haben. Sie gehen davon aus, dass diese Apoptose ein physiologischer Teil der Superkompensationsreaktion des Körpers nach Belastung ist (Boffi et al., 2002). Zu diesem Schluss kommen auch Rasera und Kollegen (2008), nachdem sie apoptotische und nekrotische Vorgänge, sowie erhöhte Werte an Leukozyten in gesunden Gelenken von belasteten Sportpferden fanden und diesen Prozess als physiologisch ansehen (Rasera et al., 2008). Eine verstärkte Lipidperoxidation nach physischer Belastung korreliert auch beim Menschen mit einem Anstieg der CK-Konzentrationen im Plasma durch Schäden der Muskulatur, wie zum Beispiel nach einem 80 km Lauf (Kanter, Lesmes & Kaminsky, 1988).

#### Oxidative Schäden an Proteinen:

Oxidative Schäden an Proteinen (und Aminosäuren) können sich, wie bereits erwähnt, auf unterschiedliche Weise manifestieren. Ein radikalischer Angriff auf Proteine resultiert meist in einer Veränderung der Seitenketten oder des  $\alpha$ -Carbon-skeletts. Die häufigsten Endprodukte einer Seitenkettenoxidation sind Hydroperoxide, Alkohole und Carbonyle (Gaut et al., 2001). Duberstein und Kollegen befassten sich im Jahr 2009 mit der Frage des Einflusses von oraler Vitamin E Supplementierung auf die Entstehung von Proteincarbonylen im Muskel belasteter Pferde. Die Vitamin E supplementierte Gruppe zeigte nach Belastung signifikant geringere Proteincarbonylierung, als die nicht-supplementierte. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Kinnunen und Kollegen (2005 a), wurde kein Anstieg der Carbonylmenge nach Belastung verzeichnet. Die Autoren äußern die Hypothese, dass die hohen Ruhewerte Zeichen einer chronischen Belastung sind, und es zu einer effektiven Clearance durch die akute Bewegung kommt (Duberstein et al., 2009).

Die vielfältigen Möglichkeiten und Auswirkungen von Radikalangriffen auf Proteine wurden zum Beispiel von Dean und Kollegen ausführlich beschrieben (Dean et al., 1997).

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Pferdepopulation und Probenentnahmeplan

Im Rahmen dieser Arbeit wurden, nach Genehmigung eines Tierversuchsantrages, von 20 Trabern im Raum Brandenburg Blutproben vor und nach einer intensiven Trainingsbelastung entnommen. Die Blutentnahme aus der *Vena jugularis* erfolgte nach Reinigung der Punktionsstelle mittels eines Alkoholtupfers. Es wurden Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA)-beschichtete Blutentnahmeröhrchen der Firma Sarstedt Medizintechnik (Nümbrecht, Deutschland) verwendet. Für die Gewinnung von Serum wurden Serumröhrchen ebenfalls von Sarstedt Medizintechnik (Nümbrecht, Deutschland) verwendet. Bei jeder Punktion wurden 10 ml Blut entnommen.

Tabelle 2 zeigt das Beprobungsschema.

**Tabelle 2: Probenentnahmeplan**

Probe	Entnahmezeitpunkt
1. Blutprobe	20 -30 Minuten vor der Belastung ( <b>V</b> )
2. Blutprobe	Innerhalb von 5 Minuten nach Ende der Belastung ( <b>N 0</b> )
3. Blutprobe	4 Stunden nach Ende der Belastung ( <b>N 4</b> )
4. Blutprobe	24 Stunden nach Ende der Belastung ( <b>N 24</b> )
5. Blutprobe	48 Stunden nach Ende der Belastung ( <b>N 48</b> )

Die Pferde wurden während der Belastung mit einem HF-Messgerät und einem „*Global Positioning System*“ (GPS)-Sender ausgestattet, um die HF und die Geschwindigkeit kontinuierlich aufzeichnen zu können. Das Training erfolgte immer im gleichen Zeitraum (vormittags), so dass die Probenentnahmen ebenfalls bei allen Pferden zur gleichen Tageszeit durchgeführt wurden.

Im Anschluss an das Training wurden die Tiere ausgeschirrt und abgewaschen. Nachdem sie 20 Minuten trockengeführt wurden, wurden sie mit Abschwitzdecken wieder in die Boxen gebracht.

Nach 4 Stunden erfolgte dann in der Box die dritte Probenentnahme.

Die vierte Blutentnahme (nach 24 Stunden = N 24) wurde in den Boxen, durchgeführt, bevor die Tiere bei guter Witterung stundenweise auf die Weide oder einem Auslauf gelassen wurden. Keines der Tiere wurde zwischen den Blutentnahmen (N 0) bis (N 48) körperlich belastet.

Die fünfte Blutentnahme (N 48) erfolgte gleichfalls im Stall. Alle Blutentnahmen wurden in ruhiger Atmosphäre durchgeführt, ohne die Tiere in Unruhe zu versetzen.

Tabelle 3 gibt die Geschlechtsverteilung der 20 Probanden an.

**Tabelle 3: Geschlechtsverteilung der 20 Probanden**

	Anzahl	Prozent
Hengst	3	15
Stute	7	35
Wallach	10	50

Gesamt	20	100
--------	----	-----

Tabelle 4 zeigt die Altersverteilung der Probanden (n = 20).

**Tabelle 4: Altersverteilung [Jahre] der 20 Probanden**

	Alter [Jahre]
Mittleres Alter ± Standardabweichung	4,8 ± 2,1
Median	5
Minimum	2
Maximum	9

Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die Körpermaße der Tiere (n = 20).

**Tabelle 5: Körpermaße der 20 Probanden**

	Größe [m]	Gewicht [kg]
Mittelwert ± Standardabweichung	1,63 ± 0,06	427,08 ± 49,17
Median	1,63	435,45
Minimum	1,50	320,00
Maximum	1,70	497,00

Die Auswahl der Probanden erfolgte möglichst unter gleicher Verteilung von Stuten und Wallachen, sowie Einbeziehung verschiedener Altersstufen.

Alle Pferde befanden sich zum Zeitpunkt der Untersuchung in Rennkondition (= volles Training). Die Tiere wurden in Boxenhaltung auf Stroh gehalten und mit Heu oder Silage und Hafer/Pellets oder Müslifutter gefüttert. Zusätzlich erhielten alle Pferde Mineralfutter der Firma Salvana (Salvana Tiernahrung GmbH, Klein-Offenseth Sparrieshoop, Deutschland). Es wurde besonders darauf geachtet, dass die Tiere seit mindestens 12 Monaten ohne längere Belastungspausen trainiert wurden, um einen möglichst ähnlichen körperlichen Fitnessgrad zu gewährleisten. Alle untersuchten Pferde befanden sich auf Renn-Niveau. Pferde, die mehr als drei oder weniger als zwei hohe Belastungen pro Woche absolvierten wurden ebenfalls nicht in die Untersuchung einbezogen. Außerdem musste ein ähnlicher Trainingsablauf gegeben sein. Die Belastung sollte aus mehreren „Heats“ (Trainingsphasen mit hoher Belastung) und einer Aufwärmphase bestehen. Die Aufwärmphase sollte ungefähr 8-10 Minuten dauern und bei einer HF von 100-160 S/min absolviert werden. Danach wurden 6 „Heats“ gefahren (jeder „Heat“ dauerte etwa 60-90 Sekunden). Die anschließenden 5-10 Minuten wurden in langsamerem Trab gefahren.

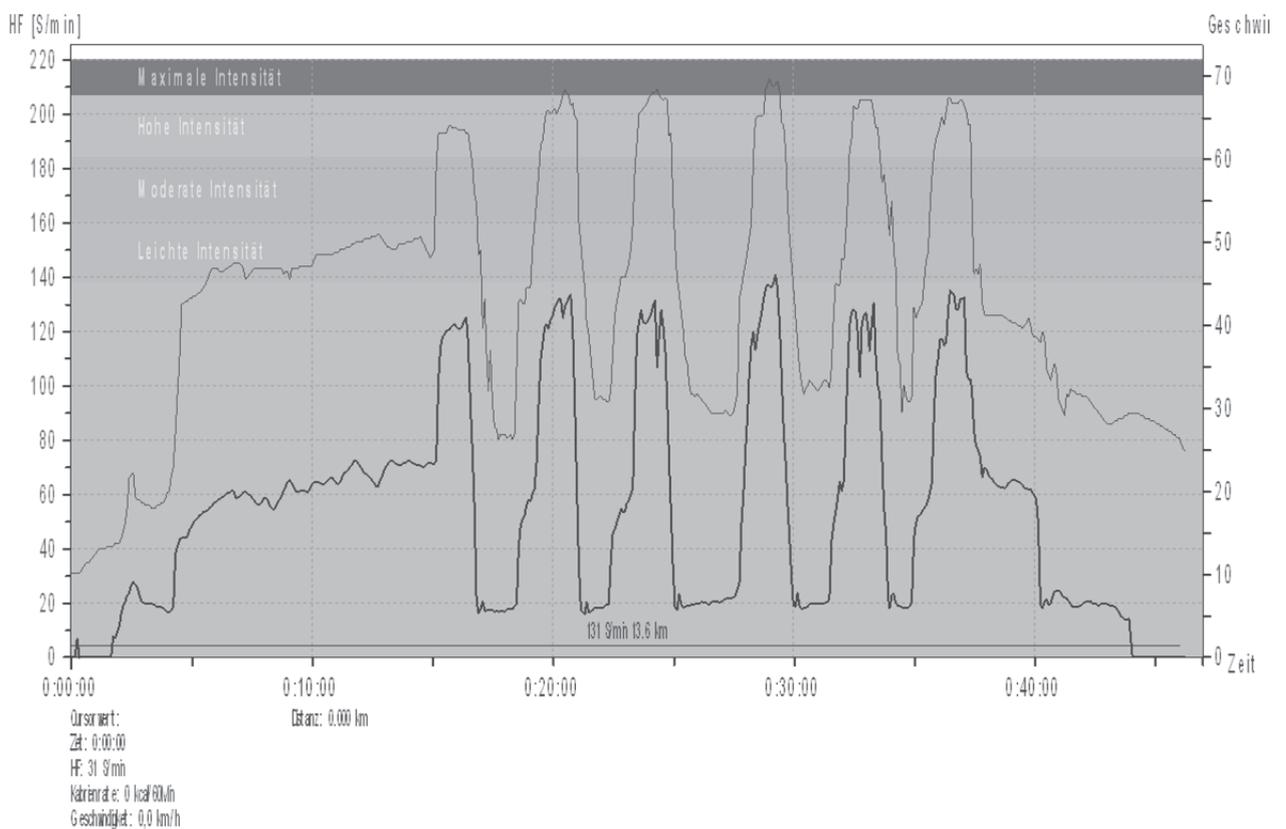
Insgesamt nahmen fünf verschiedene Trainer an der Studie teil. Alle Tiere wurden zweimal pro Woche intensiv belastet und erhielten ansonsten langsames Training oder Weidegang. Die Pferde wurden nach einer Allgemeinuntersuchung vor dem Training als gesund befunden.

### 3.2 Herzfrequenzaufzeichnung

Die kontinuierliche Bestimmung der HF, sowie der gelaufenen Distanz und der Geschwindigkeit, erfolgte mit dem Polar Equine RS800CX™ G3 Modell (Polar Electro GmbH, Büttelborn, Deutschland).

Diese Ausrüstung besteht aus einem Elektrodengurt mit Signalverstärker und Transmitter (Sender), einem GPS-Sensor und einer Empfängeruhr, die alle Daten speichert. Das HF-Signal wird von einer positiven Elektrode, die eine Handbreite unterhalb des Widerrists dem Fell dicht anliegt, und einer negativen Elektrode, die auf Höhe des Ellbogenhöckers positioniert ist, abgeleitet. Im Sender wird dieses Signal transformiert und verstärkt.

Der Sender sendet die Daten an die Empfängeruhr, die vom Fahrer getragen wird. Der GPS-Sensor wird ebenfalls vom Fahrer getragen und sendet die Daten an die Empfängeruhr. Von dieser werden anschließend alle Daten an die Polar Pro Trainier Equine Edition Software (Software Polar ProTrainer 5; Polar Electro GmbH, Büttelborn, Deutschland) übertragen und gespeichert. Als Beispiel sind zwei Belastungsaufzeichnungen abgebildet.



**Abbildung 14: Herzfrequenz- und Geschwindigkeitsaufzeichnung eines Trainings mit GPS Sender.**

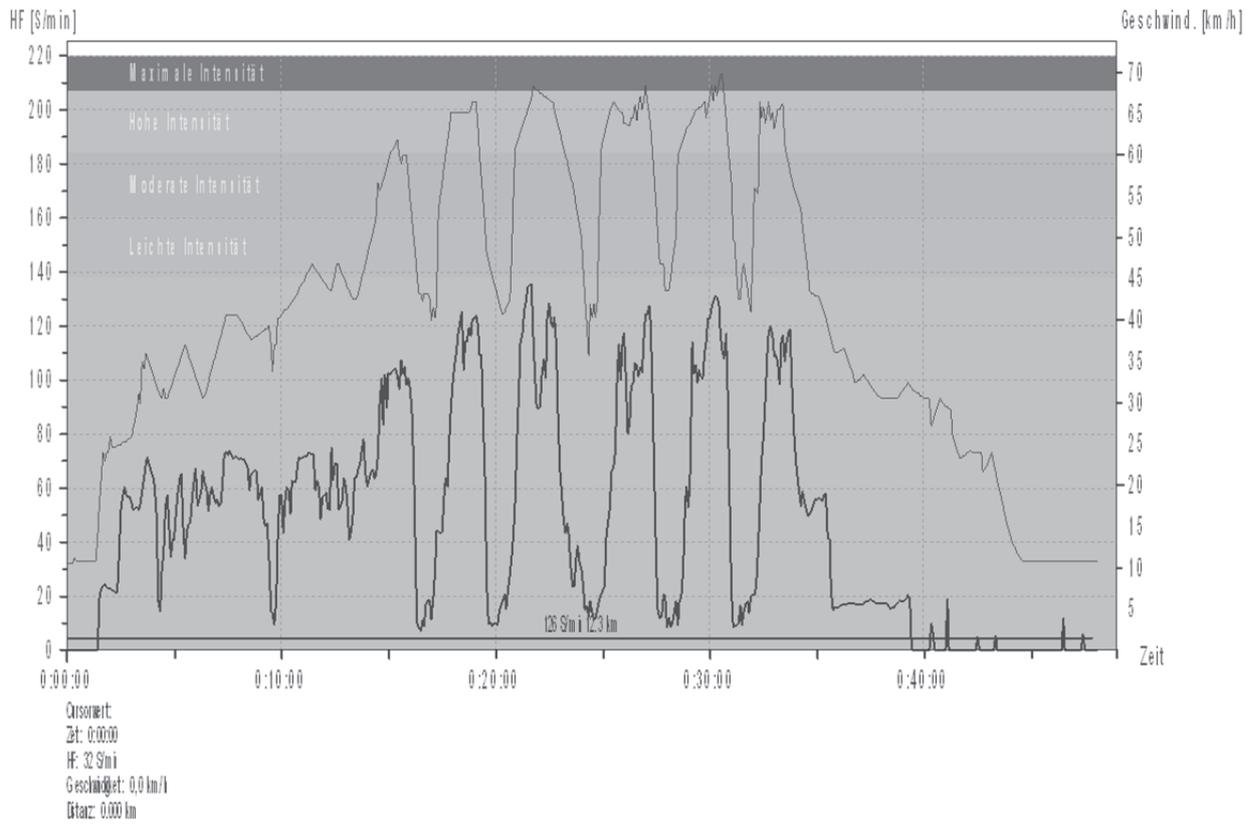
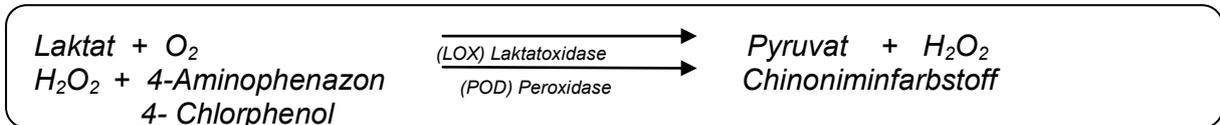


Abbildung 15: Herzfrequenz- und Geschwindigkeitsaufzeichnung eines Trainings mit GPS Sender (2).

### 3.3 Laktatmessung

Die Laktatbestimmung im Blut erfolgte mit dem Dr. Lange Photometer (DR. Lange Küvetten-Test, LKM 140, Berlin, Deutschland), nach dem folgenden Reaktionsprinzip:



**Abbildung 16: Reaktionsprinzip der Laktatbestimmung mit dem Dr. Lange Photometer**

Dabei wird Laktat durch Laktatoxidase zu Pyruvat oxidiert, wobei  $\text{H}_2\text{O}_2$  entsteht, welches unter dem Einfluss der Peroxidase mit 4- Aminophenazon und 4-Chlorphenol einen Chinoniminfarbstoff bildet. Dieser wird bei 520 nm photometrisch gemessen.

Unmittelbar nach der venösen Blutentnahme aus der ungestauten Vene wurden 10  $\mu\text{l}$  Vollblut in eine Pufferlösung gegeben. Diese enthält 4-Chlorphenol, Peroxidase, Natriumazid und ein Detergenz, bei einem pH- Wert von 7,0. Nach Lagerung bei 2 – 8° wurde der Laktatwert noch vor Ort photometrisch bestimmt.

Vor jeder Serienmessung wurde eine Kontrollmessung mittels eines mitgelieferten Standards durchgeführt.

Durch einen Glykolysehemmstoff (Fluorid) wird verhindert, dass nach Hämolyse der Erythrozyten unspezifisch Glukose zu Laktat abgebaut wird.

Da auch der Hämatokritgehalt einer Probe das Ergebnis beeinflussen kann, wird durch die Software des Miniphotometers LP20 eine Hämatokritkorrektur durchgeführt. Diese bezieht sich auf die Anfangsextinktion der Probe vor dem Start der chemischen Reaktion. Es wird dabei vorausgesetzt, dass der Hämatokrit in erster Näherung dem Hämoglobingehalt der Probe, und damit der Anfangsextinktion proportional ist.

Zur Prüfung, ob die durch das Miniphotometer gemessenen Laktatwerte eine Hämatokritabhängigkeit aufweisen, wurde venöses Blut zentrifugiert und so konzentriert. Anschließend wurde es mit dem Plasma des gleichen Probanden gemischt. Ein Einfluss des Hämatokrits auf die gemessenen Laktatwerte war nicht festzustellen.

Der Zusammenhang zwischen gefundenem und erwartetem Wert bei Aufstockversuchen mit venösem Blut ist linear. Die Linearität bleibt bei Einsatz von Vollblut bis zu einem Laktatwert von 30 mmol/l erhalten.

### 3.4 Serumenzyme und Kreatinin

Die Aktivitätsbestimmung der Enzyme CK, AST und Gamma-Glutamyltransferase (GGT) sowie des Kreatinins im Serum, erfolgte im Labor der Klinik für Klauentiere der Freien Universität Berlin.

Die CK-Aktivitätsmessung erfolgte photometrisch nach der NAC-(N-Acetylcystein)-Methode über die Zunahme von NADH bestimmt (LT-CK 0064, Labor + Technik (LT-SYS®), Berlin, Deutschland). Die CK wird durch die Thiol-Komponente N-Acetyl-Cystein (NAC) aktiviert. Daraufhin katalysiert die CK die Bildung von ATP aus Kreatinphosphat und Adenosindiphosphat (ADP). Das ATP bildet Glukose-6-Phosphat in einer Hexokinase katalysierten Reaktion. Das Glucose-6-Phosphat wird zu 6-Phosphoglukonat oxidiert, und NADP wird in einer durch Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase katalysierten Reaktion zu NADPH reduziert.

Die AST-Aktivität wurde ebenfalls durch enzymkinetische Messung bestimmt [LT-AST 062, Labor + Technik (LT-SYS®), Berlin, Deutschland] Kreatinin wurde mit der Jaffé - Methode durch eine kinetische Messung des Kreatininpinkrat-Komplex (gelb-orange) aus Kreatinin + Pikrinsäure bestimmt.

Alle verwendeten Chemikalien und Testkits wurden von Labor und Technik GmbH bezogen. Die LDH wurde mit einem kommerziellen Testkit der Firma Roche Diagnostic photometrisch bestimmt (Cytotoxicity Detection Kit, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland). Die Ergebnisse werden als U/l angegeben.

### **3.5 Blutbild**

Die Analyse des roten und weißen Blutbildes erfolgte mit dem ABACUS Junior vet 5 Coultergerät (Medizintechnik Frank Guder GmbH & Co. KG, Bad Oeynhausen, Deutschland) im Labor der Pferdeklinik der Freien Universität Berlin. Das Differentialblutbild wurde ebenfalls zu allen Blutentnahmezeitpunkten bestimmt. Dazu wurde ein Ausstrich angefertigt und eine Zellfärbung durchgeführt. Die Auszählung und Differenzierung der Zellen erfolgte manuell.

### **3.6 Gesamteiweißkonzentration**

In dieser Arbeit wurde die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (Bradford, 1976). Hierzu wurde in eine Mikrotiterplatte 10 µl Standard (human IgG im Konzentrationsbereich von 0 - 1 mg/ml in PBS), bzw. 10 µl Probe (Plasma) in Doppelwerten pipettiert. Anschließend wurden 200 µl Bradfordreagenz zugegeben, 5 Minuten schüttelnd inkubiert und dann im Mikrotiterplatten-Spektralphotometer (SpectraMini®, Fa. Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bei 620 nm gemessen. Die resultierenden optischen Dichten konnten anhand der Standarddeichkurve computergestützt ausgewertet werden. Zusammensetzung des Bradfordreagenz:

- Coomassie Brill. Blue R-250® 0,1 g (Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Phosphorsäure (85%) 100,0 ml
- Ethanol (95%) 50,0 ml
- Aqua dest. 1000,0 ml

Die Angaben erfolgen in mg/ml.

### **3.7 Myeloperoxidase**

#### **3.7.1 Aktivitätsbestimmung**

Die Aktivitätsbestimmung der MPO erfolgte photometrisch mit einem O-Dianisidine Assay. Die Bestimmung wurde am Institut für Veterinär-Biochemie der Freien Universität Berlin durchgeführt und erfolgte nach der Methode von Kumar und Kollegen (Kumar et al., 2002) unter Berücksichtigung der Anpassungen von Fietz (2008).

Die Aktivität der MPO wird in Unit angegeben. Dabei entspricht 1 Unit der Menge MPO, die 1 mM O-Dianisidin/min oxidiert.

Der Probenansatz für eine Messung setzte sich zusammen aus:

- 270 µl 0,1 Mol (M) Natrium Citratpuffer, pH 5,5 (mit NaOH eingestellt)
- 0,32 µl Triton-X-100 (Triton® X-100, Ferak Berlin GmbH, Berlin, Deutschland)
- 2,5 µl 82,4 mM O-Dianisidin/Dimethylsulfoxid (DMSO)  
(O-Dianisidin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)  
(Dimethylsulfoxid, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

Von diesem Substratmix wurden bei der MPO-Aktivitätsbestimmung aus dem Serum 250 µl eingesetzt. Einem Doppelansatz ohne MPO-Inhibitor wurden jeweils 10 µl Citratpuffer zugegeben. Gleichzeitig wurden 10 µl eines MPO-spezifischen Inhibitors (ABAH Myeloperoxidase Inhibitor 1, Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) einem weiteren Ansatz zugegeben. Allen drei Ansätzen werden 30 µl Serum zugegeben (Probenvolumen).

Anschließend wurde die Reaktion mit 1,31 µl verdünntem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 990 µl aqua dest.) gestartet (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30%; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen). Unmittelbar nach Zugabe des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde die Absorption in einer Mikrotiterplatte bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem Photometer (Model 550 Microplate Reader, Fa. Bio-RAD Laboratories, Inc., München, Deutschland) gemessen. Die Absorptionsmessung erfolgte im Abstand von 5 Minuten über einen Zeitraum von 30 Minuten.

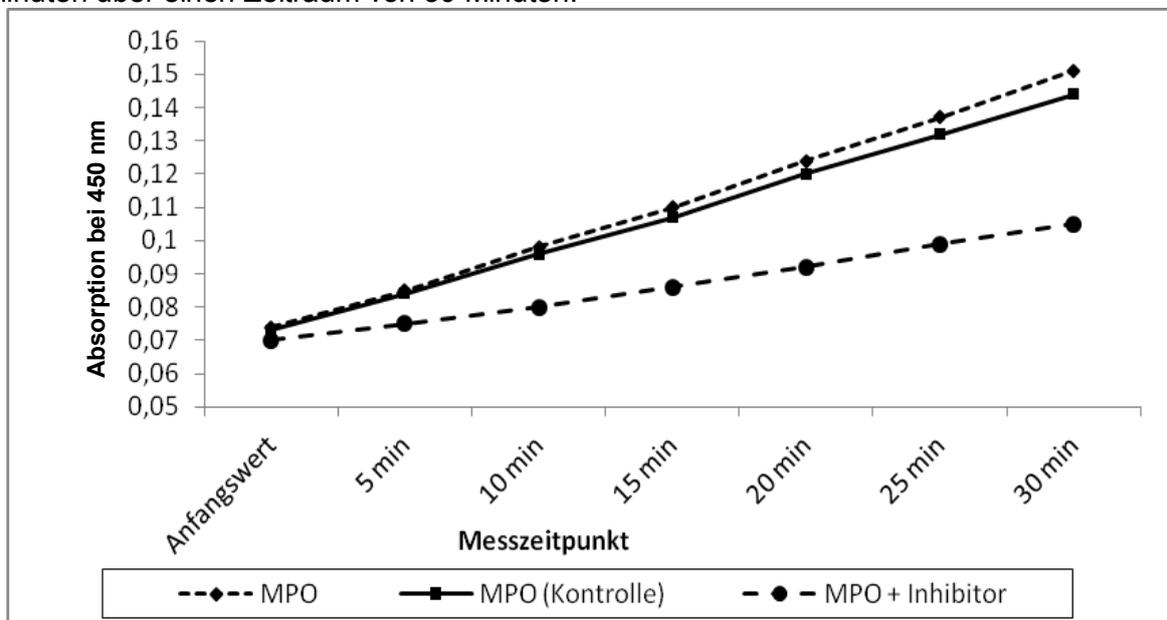


Abbildung 17: Beispielhafte Myeloperoxidase-Aktivitätsbestimmung im Pferdeserum.

Die Linearität wurde mit der Software ® 4.01 (Microplate Manager, Bio-Rad Laboratories, Inc., München, Deutschland) überprüft. Die Aktivität der MPO lässt sich mit folgender Gleichung zur Bestimmung der Volumenaktivität eines Enzyms berechnen:

$$(U/ml) = \frac{\Delta E \times V}{t \times \epsilon \times d \times v}$$

$\Delta E$  Differenz aus Extinktion des Endwertes und Extinktion des Anfangswertes

$t$  Zeit (30 Minuten)

$\epsilon$  spezifischer millimolarer Extinktionskoeffizient für MPO bei 450 Nanometer und 25°C  
= 11,48 x Millimol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>

$V$  Volumen der Messlösung

$v$  Probenvolumen

$d$  Schichtdicke der Küvette

Bei der Berechnung wurde die MPO-Volumenaktivität der Probe mit Inhibitor von dem Wert der Probe ohne Inhibitor abgezogen.  
 Reine MPO (Fa. Calbiochem®, Bad Soden, Deutschland) wurde als Referenz eingesetzt.  
 Die Interassayvarianz betrug 0,0031.

Abbildung 18 zeigt beispielhaft die Hemmung von reiner MPO (5 µM) ohne und mit ABAH-Inhibitor (30 µM).

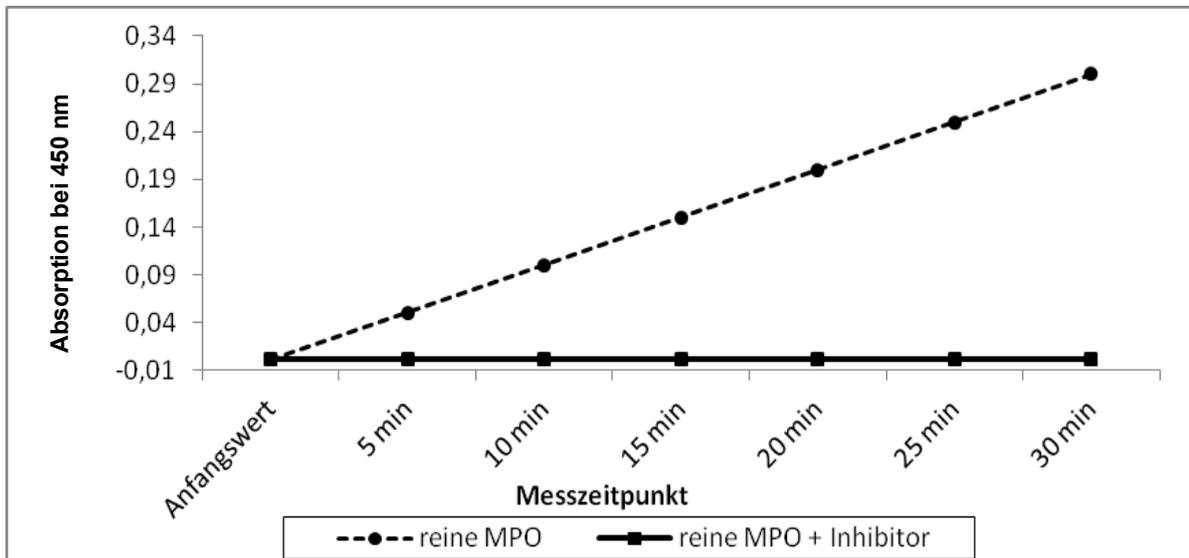


Abbildung 18: Beispiel der Hemmung reiner Myeloperoxidase in U/ml.

### 3.7.2 Peroxidaseaktivität im Serum

Da die MPO durch Zugabe eines spezifischen Inhibitors gehemmt werden kann, entspricht die Absorptionzunahme ohne Subtraktion des Inhibitors der Gesamtserumperoxidaseaktivität (bezogen auf eine Oxidation von O-Dianisidin). Auf diese Weise lässt sich der Anteil der MPO-Aktivität an der Gesamtperoxidaseaktivität im Serum bestimmen.

## 3.8 Malondialdehydkonzentration

Das MDA im Pferdeserum wurde mit dem OxiSelect™ TBARS Assay Kit (MDA-Quantitation) der Firma Cell Biolabs, INC. (San Diego, USA) bestimmt.

Das Serum wurde bei – 80 °C tiefgefroren und die Messung erfolgte innerhalb eines Monats. Die MDA Messung ist eine häufig benutzte Methode zum Nachweis der Lipidperoxidation. Malondialdehyd reagiert mit zwei Molekülen Thiobarbitursäure (TBA) zu einem roten Farbstoff (Schiffsche Base), dessen Konzentration fluoresszenzphotometrisch bestimmt werden kann.

Die Testdurchführung erfolgte nach dem vom Hersteller beschriebenen Verfahren. Zur Minimierung späterer Oxidation, die das Ergebnis verfälschen könnte, wurde jeder Probe Butylhydroxytoluol hinzugefügt.

Nach Zugabe der Lysis Lösung wurden die Proben 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde TBA Reagent hinzugefügt. Hierzu wurde eine Lösung aus TBA

(Thiobarbitursäure) in einer Konzentration von 5,2 mg/ml in einer sauren Lösung hergestellt. Mit Hilfe von Natrium Hydroxide Lösung wurde dann ein pH-Wert von 3,5 eingestellt und 250 µl zu jedem Ansatz pipettiert.

Anschließend folgte eine 45-60 minütige Inkubation der Proben bei 95 °C. Im Anschluss daran wurden die Proben im Eisbad fünf Minuten auf Raumtemperatur herunter gekühlt, bevor sie 15 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert wurden.

Jede Probe wurde als Doppelansatz gemessen und bei jeder Messung eine Standardkurve (ebenfalls als Doppelansatz) anhand von MDA-Standards hergestellt.

150 µl der Proben wurden jeweils in eine schwarze 96 Well Mikrotiterplatte pipettiert.

Die Messung erfolgte fluorimetrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm und einer Emission von 590 nm.

Da der Test auch eine spektrophotometrische Messung erlaubt, wurde zu Vergleichszwecken bei vier Pferden auch eine spektrophotometrische Messung durchgeführt. Dabei zeigte sich eine gute Korrelation der Ergebnisse. Aufgrund der höheren Genauigkeit der fluorimetrischen Messung wurde diese jedoch als Standardmessmethode für diese Studie festgelegt.

### 3.9 Konzentration der proteingebundenen Carbonyle

Die Bestimmung der proteingebundenen Carbonyle erfolgte durch die Firma Immundiagnostik AG, Bensheim. Es wurde hierzu der Carbonyl Protein ELISA Kit (K 7822) eingesetzt. Die Bestimmung erfolgte in EDTA-Plasma, das zuvor bei – 40 °C gelagert wurde. Da der Proteincarbonylgehalt auf die Gesamtproteinmenge bezogen wird, wurde parallel eine Proteinbestimmung durchgeführt. Es ist notwendig den Carbonylproteingehalt auf den Gesamtproteingehalt zu beziehen, da der Proteingehalt aufgrund des Ultrafiltrationsvorganges schwanken kann.

Die Proteine in der Probe wurden mit Dinitrophenylhydrazin (DNPH) 45 Minuten bei Raumtemperatur derivatisiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 11000 x g. Um überschüssiges DNPH aus den Proben zu entfernen folgten mehrere Ultrafiltrationsschritte. Diese Zentrifugenfiltrationseinheiten haben eine Ausschlussgröße von 10kDa. Hiermit werden alle Proteine >10kDa zurückgehalten, aber das deutlich kleinere DNPH tritt durch den Filter. Weitere Zentrifugationsschritte mit wiederholter Zugabe von Assaypuffer führt dazu, dass eventuell doch zurückgebliebenes DNPH herausgewaschen wird. Die so erhaltenen derivatisierten und von freiem DNPH befreiten Proteine wurden an die Mikrotiterplatte gebunden und mit einem anti-DNPH Antikörper detektiert. Die Extinktion wurde mit einem Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm gemessen, und die Carbonyl-Konzentration mittels einer Standardkurve bestimmt. Die Erstellung der Standardkurve erfolgte mit Hilfe von oxidiertem Serumalbumin.

Zur Ermittlung des Carbonylproteingehaltes wurde die ermittelte Carbonylkonzentration auf den Gesamtproteingehalt der Probe bezogen. Zur Berechnung wurden die Proteinwerte nach Bradford herangezogen.

Die Durchführung erfolgte nach den angegebenen Vorgaben. Es wurde Doppelansätze jeder Probe bestimmt. Die Konzentrationen der Proben können direkt anhand der Standardkurve ausgewertet werden. Der Carbonylgehalt wird mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$CP_{\text{Probe}} \text{ (pmol/mg) normiert} = \frac{CP_{\text{Probe}} \text{ (pmol/mg)} \times \text{Proteine}_{\text{Standard}} \text{ (mg/ml)}}{\text{Proteine}_{\text{Probe}} \text{ (mg/ml)}}$
<p><b>CP<sub>Probe</sub>:</b> Carbonylproteingehalt der Probe in pmol/mg, ermittelt anhand der Standardkurve im Assay</p>
<p><b>Proteine<sub>Standard</sub>:</b> Proteingehalt des höchsten Standards (bekannter Standardwert), ermittelt mit dem BCA-Test in mg/ml</p>
<p><b>Proteine<sub>Probe</sub>:</b> Proteingehalt der Probe, ermittelt mit dem BCA-Test in mg/ml</p>

Der vom Hersteller angegebene Normbereich liegt für EDTA-Plasma beim Menschen bei 75 – 200 pmol.

### 3.10 Statistische Auswertung

Die statischen Auswertungen wurden mit Hilfe von SPSS für Windows, Version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt.

Alle Parameter wurden mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung geprüft. Während für einige der getesteten Variablen die Nullhypothese „Normalverteilung“ zu mindestens einem Beprobungszeitpunkt abgelehnt wurde (Shapiro-Wilk-Test:  $p < 0,05$ ), konnte die Hypothese für andere Variablen zu allen Beprobungszeitpunkten nicht verworfen werden (Shapiro-Wilk-Test:  $p \geq 0,05$ ). Dabei handelte es sich um die Parameter Leukozyten, MDA, LDH und neutrophile Granulozyten. Für diese Parameter wurden Methoden der parametrischen Statistik zur Auswertung herangezogen. Beim Vergleich von mehr als 2 verbundenen Stichproben wurde das allgemeine lineare Modell mit Messwiederholungen verwendet ( $\alpha = 0,05$ ). Im Falle der Ablehnung der globalen Nullhypothese wurden paarweise Vergleiche mit Bonferroni Korrektur mit Hilfe des t-Tests für abhängige Beobachtungen durchgeführt ( $\alpha = 0,005$ ). Die Parameter, für die die Annahme „Normalverteilung“ zu mindestens einem Beobachtungszeitpunkt abgelehnt wurde, wurden mit Methoden der nichtparametrischen Statistik ausgewertet. Beim Vergleich von mehr als 2 verbundenen Stichproben fand der Friedman-Test Anwendung ( $\alpha = 0,05$ ). Paarweise Vergleiche im Falle der Ablehnung der globalen Hypothese wurden mit dem Wilcoxon-Test und Bonferroni Korrektur durchgeführt ( $\alpha = 0,005$ ).

Im Text werden arithmetisches Mittel und Standardabweichung angegeben, bei den Parametern, für die keine Normalverteilung unterstellt werden der Median und das erstes und dritte Quartil.

Die Korrelation zwischen zwei normalverteilten Parametern wurde durch den Korrelationskoeffizienten nach Pearson und zwischen nicht normalverteilten der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman- Rho berechnet. Im Falle einer signifikanten Korrelation ( $\alpha = 0,05$ ) wurde nach folgender Einteilung bewertet:

$r = 0,5 - 0,7 \rightarrow$  mittlere Korrelation  
 $r = 0,7 - 0,9 \rightarrow$  hohe Korrelation  
 $r = >0,9 \rightarrow$  sehr hohe Korrelation

In den grafischen Darstellungen, wurden die Parameter für die getesteten Pferde über den Beprobungszeitraum dargestellt. Relevante signifikante Unterschiede zwischen den Beprobungszeitpunkten wurden mit einem Sternchen verdeutlicht.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Belastung und Intensität

#### 4.1.1 Trainingsdaten und Herzfrequenz

Die Einschätzung der Belastungsintensität erfolgte anhand von Eckdaten der Belastung (Dauer, Distanz und Geschwindigkeit), sowie durch physiologische Variablen (HF, Laktat, CK, AST, LDH). Tabelle 6 enthält die Daten der Trainingsbelastung.

**Tabelle 6: Eckdaten der Belastungsstatistik zur Trainingsbelastung  
(n = 20).**

	Distanz [km]	Dauer [min]	HF in Ruhe [S/min]	HF maximal (max) [S/min]	HF durch- schnittlich [S/min]	Tempo durch- schnittlich [km/h]	Tempo max [km/h]
Mittelwert	12,67	45,05	37,5	208,9	134,75	19,53	44,88
Median	13	45	34	210,5	133,5	19,6	45,95
Standardabweichung	1,66	5,05	8,26	6,16	8,12	2,06	4,4
Minimum	10,1	35	30	194	122	16,4	37,8
Maximum	17,6	55	59	216	154	24,9	52,2

### 4.1.2 Laktat

Die Erhöhung des Medianwertes von 0,93 mmol/l (1. Quartil ( $Q_1$ ) = 0,90 / 3. Quartil ( $Q_3$ ) = 0,97) in Ruhe auf 6,94 mmol/l ( $Q_1$  = 4,8 /  $Q_3$  = 13,88) zum Zeitpunkt N 0 lag bei 646 %. Der Median lag infolge der Belastung (zum Zeitpunkt N 0) statistisch signifikant höher, als in Ruhe ( $p \leq 0,05$ ).

Bereits nach 4 Stunden zeigten sich die Werte mit 1,47 mmol/l ( $Q_1$  = 1,26 /  $Q_3$  = 1,66) wieder deutlich niedriger, als nach der Belastung ( $p \leq 0,05$ ).

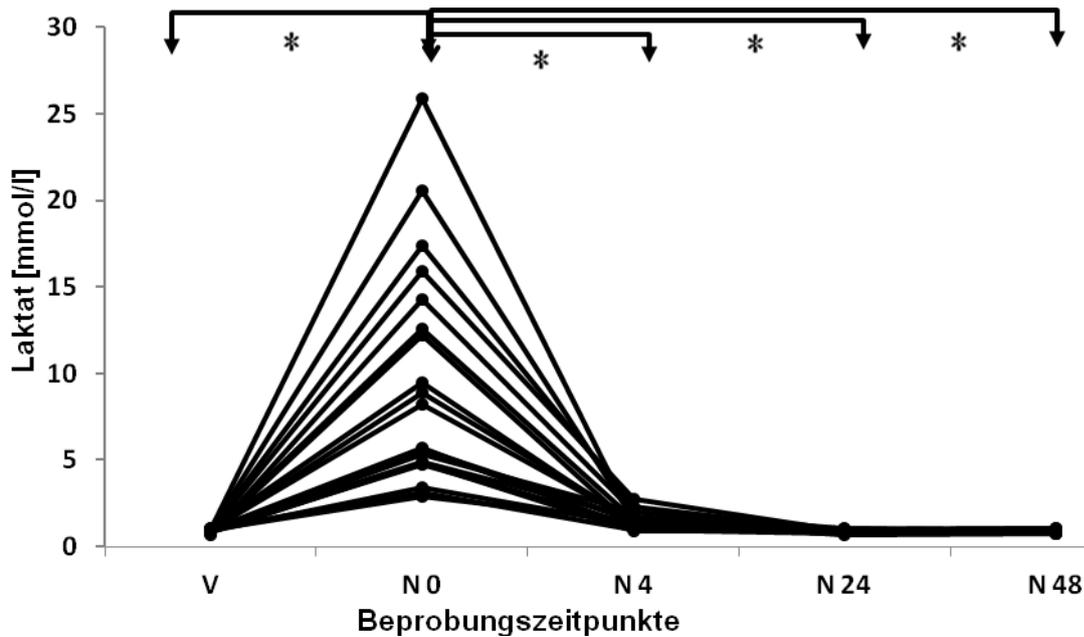


Abbildung 19: Der Blutlaktatgehalt [mmol/l] zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (n= 20). Ein \* bezeichnet einen signifikanten ( $p \leq 0,05$ ) Unterschied zwischen den Beprobungszeitpunkten.

Nach 24 und 48 Stunden lag der Median der Blutlaktatwerte wieder annähernd auf Ruhenniveau (0,95 mmol/l bzw. 0,91 mmol/l).

Die Veränderungen der Blutlaktatwerte sind in Tabelle 7 dargestellt.

### 4.1.3 Serumenzyme

Laktat-Dehydrogenase:

Die LDH zeigte einen mittleren Ruhewert von  $432,76 \pm 109,6$  U/l (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) vor Belastung. Nach Belastung lag der Mittelwert mit  $491,3 \pm 112,3$  U/l statistisch signifikant höher ( $p \leq 0,05$ ).

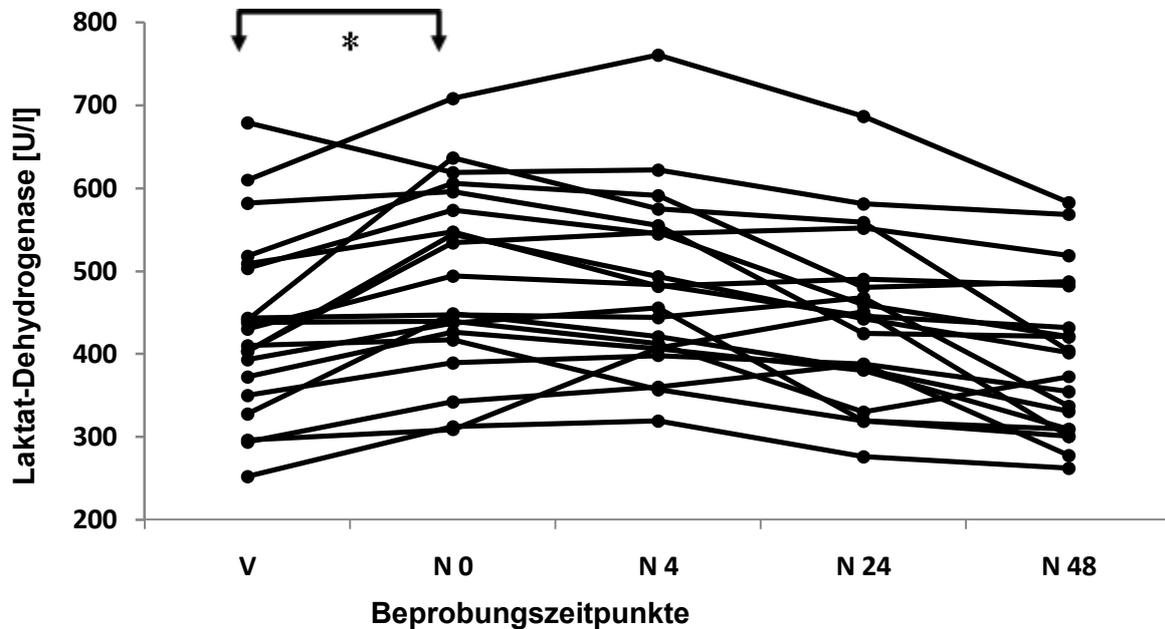


Abbildung 20: Die Laktat-Dehydrogenase im Serum zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten (n=20) [U/l]. Ein \* bezeichnet einen signifikanten ( $p \leq 0,05$ ) Unterschied zwischen den Beprobungszeitpunkten.

Abbildung 20 zeigt die LDH-Aktivität im Serum zu den Beprobungszeitpunkten. Die Enzymwerte sind in Tabelle 9 im Anhang angegeben.

## Kreatin-Kinase:

Vor der Trainingseinheit lag der Median der CK bei 249 U/l ( $Q_1 = 225,25 / Q_3 = 291,75$ ) (im Mittel  $257,7 \pm 52,51$  U/l).

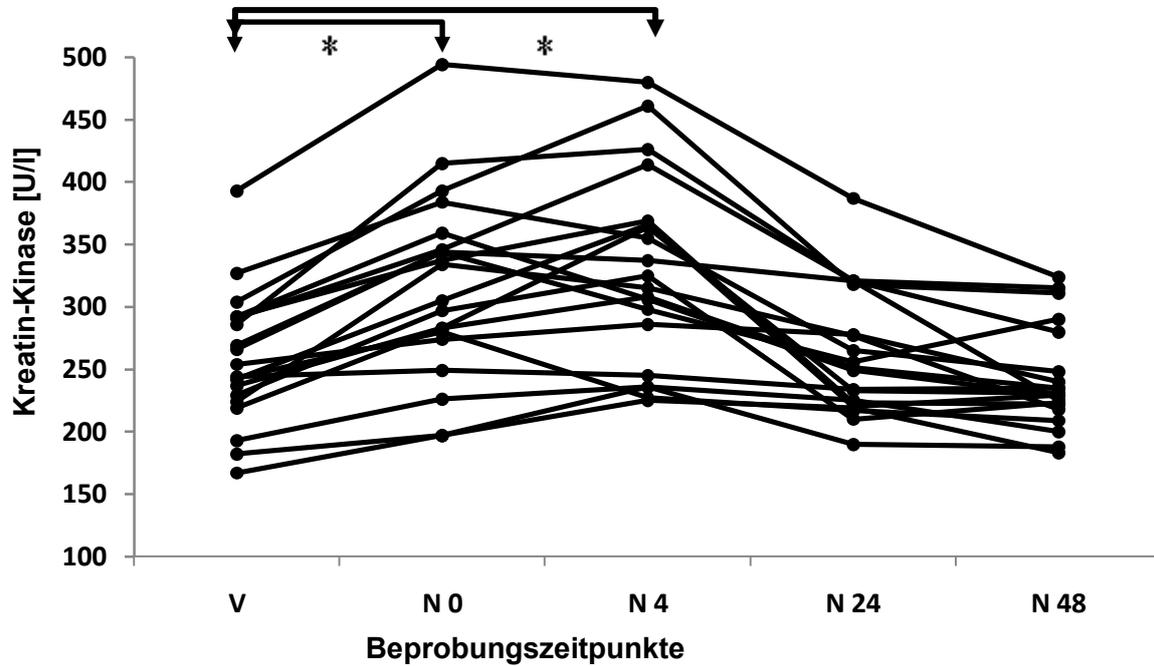


Abbildung 21: Die Kreatin-Kinase im Serum zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten [U/l] (n=20). Ein \* bezeichnet einen signifikanten ( $p \leq 0,05$ ) Unterschied zwischen den Beprobungszeitpunkten.

Nach 24 Stunden lag der Medianwert mit 250 U/l ( $Q_1 = 220,75 / Q_3 = 308$ ) wieder im Bereich der Ausgangswerte (im Mittel  $260,8 \pm 50,28$  U/l). Die Unterschiede zwischen den Beprobungen nach Belastung (N 0) sowie nach vier Stunden (N 4) wiesen signifikante Unterschiede zum Ruhewert auf ( $p \leq 0,05$ ). Abbildung 21 zeigt die CK zu den Beprobungszeitpunkten.

Die Werte sind als Einheiten (U/l) in Tabelle 9 im Anhang aufgeführt.

## Aspartat-Amino-Transferase:

Der Median der AST-Aktivität zeigte zwischen den Untersuchungszeitpunkten vor und nach Belastung einen Anstieg von 325 U/l ( $Q_1 = 305 / Q_3 = 367,5$ ) (V) auf 361 U/l ( $Q_1 = 324 / Q_3 = 397$ ) (N 0) ( $p \leq 0,05$ ). Die Werte gibt Tabelle 9 im Anhang wieder.

Abbildung 22 zeigt die AST zu den Beprobungszeitpunkten.

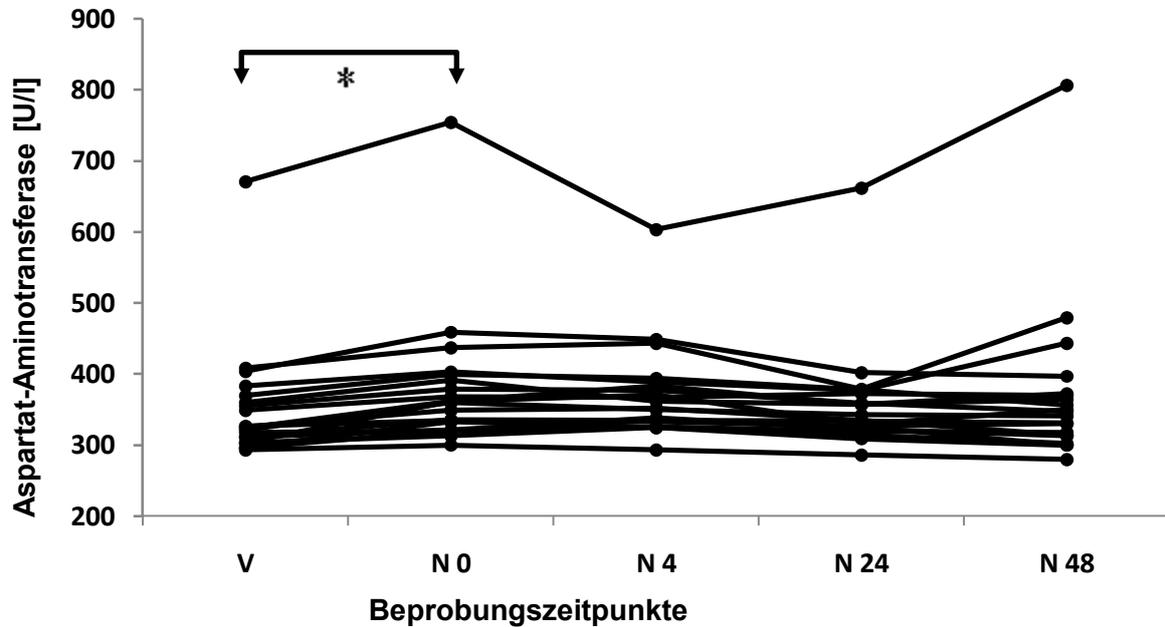


Abbildung 22: Die Aspartat-Amino-Transferase im Serum zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten [U/l] (n=20). Ein \* bezeichnet einen signifikanten ( $p \leq 0,05$ ) Unterschied zwischen den Beprobungszeitpunkten.

## 4.2 Veränderungen ausgewählter hämatologischer Parameter

### 4.2.1 Leukozyten

In Ruhe lagen die mittleren Werte bei  $6,96 \pm 0,97$  Giga (G)/l. Nach der Belastung war eine Zunahme sichtbar ( $8,06 \pm 1,21$  G/l), die innerhalb der nächsten 4 Stunden auf einen Mittelwert von  $9,46 \pm 1,37$  G/l anstieg. Die Erhöhung zeigte sich signifikant zum Ausgangswert ( $p \leq 0,05$ ).

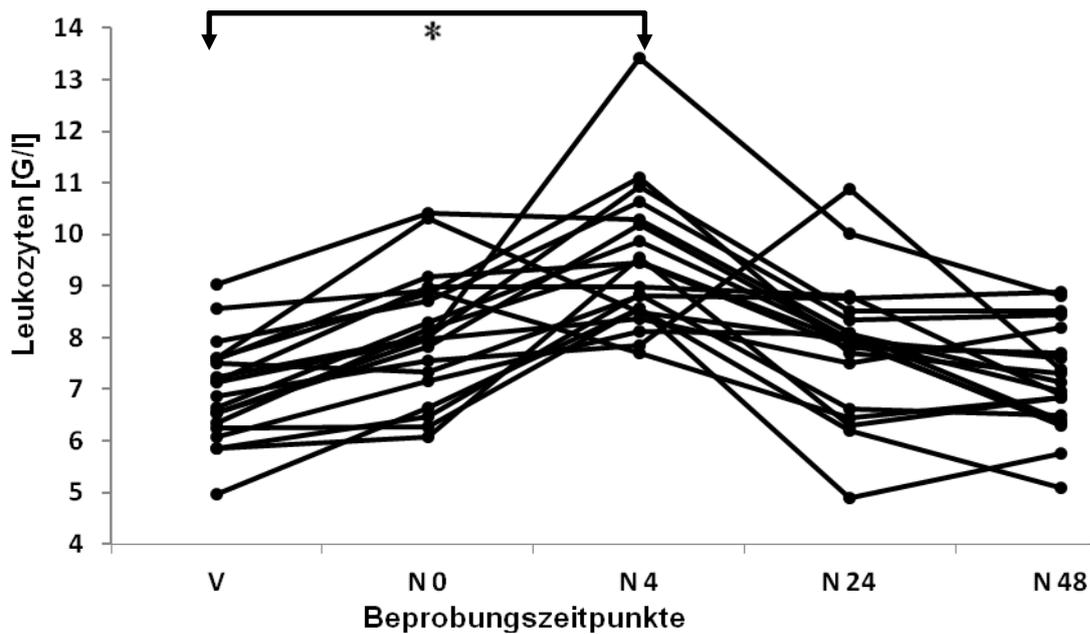


Abbildung 23: Die Leukozytenkonzentration im Blut zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten [G/l] (n=20). Ein \* bezeichnet einen signifikanten ( $p \leq 0,05$ ) Unterschied zwischen den Beprobungszeitpunkten.

Im Verlauf der nächsten 48 Stunden sanken die Werte, annähernd wieder auf Ruhenniveau. Die Ergebnisse sind in  $G/l = \times 10^9/l$  angegeben. Tabelle 11 im Anhang enthält die Werte der Leukozyten.

Nach der Belastung erreichen oder überschreiten einige Tiere den Wert von 10 G/l und liegen daher im für Pferde als nicht physiologisch angesehenen Bereich (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 1982).

Tabelle 12 im Anhang zeigt weitere zelluläre Parameter (Monozyten, Leukozyten, eosinophile und basophile Granulozyten) im Blut von 20 Trabern nach Trainingsbelastung über den Beprobungszeitraum von 48 Stunden.

### 4.2.2 Neutrophile Granulozyten

Die Ruhewerte der neutrophilen Granulozyten lagen im Mittel bei  $3,57 \pm 0,68$  G/l. Direkt nach dem Training lag der Mittelwert bei  $3,92 \pm 0,95$  G/l. Maximalwerte wurden nach 4 Stunden erreicht ( $5,75 \pm 1,07$  G/l) und zeigten sich signifikant erhöht im Vergleich zum Ruhewert ( $p \leq$

0,05). Nach 48 Stunden betragen die Werte  $3,83 \pm 0,67$  G/l. Die Konzentration der neutrophilen Granulozyten zeigen Abbildung 24 und Tabelle 11 im Anhang.

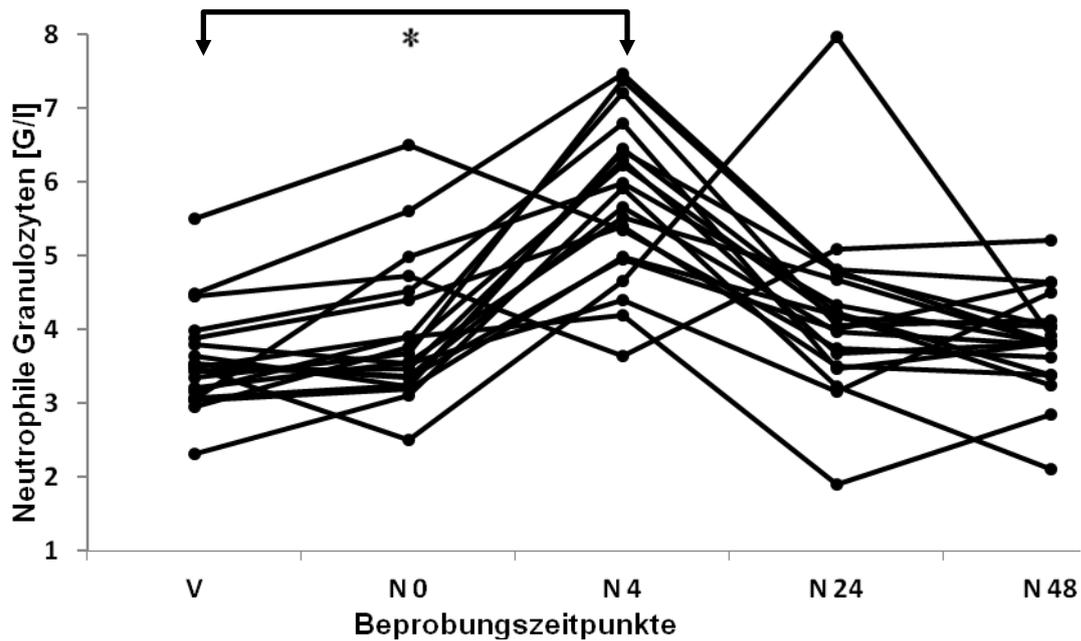


Abbildung 24: Die Konzentration der neutrophilen Granulozyten zu verschiedenen Beprobungszeiten [G/l] (n=20). Ein \* bezeichnet einen signifikanten ( $p \leq 0,05$ ) Unterschied zwischen den Beprobungszeitpunkten.

Das N/L-Verhältnis zeigte nach 4 Stunden einen signifikanten ( $p \leq 0,05$ ) Anstieg im Vergleich zu den Ruhewerten und zu N0. Der Medianwert lag vor der Belastung bei 1,12 ( $Q_1 = 0,97 / Q_3 = 1,47$ ) (im Mittel  $1,23 \pm 0,5$ ). Dagegen betrug er 4 Stunden nach dem Training 2,32 ( $Q_1 = 1,69 / Q_3 = 2,91$ ) (im Mittel  $2,3 \pm 0,8$ ) (vergleiche Tabelle 13 im Anhang).

### 4.2.3 Verhältnis stabkernige/segmentkernige neutrophile Granulozyten

Der Median des Anteils der juvenilen (stabkernigen) Granulozyten zu den reifen (segmentkernigen) lag vor Belastung bei 0,16 ( $Q_1 = 0,11 / Q_3 = 0,21$ ) (im Mittel  $0,171 \pm 0,09$ ).

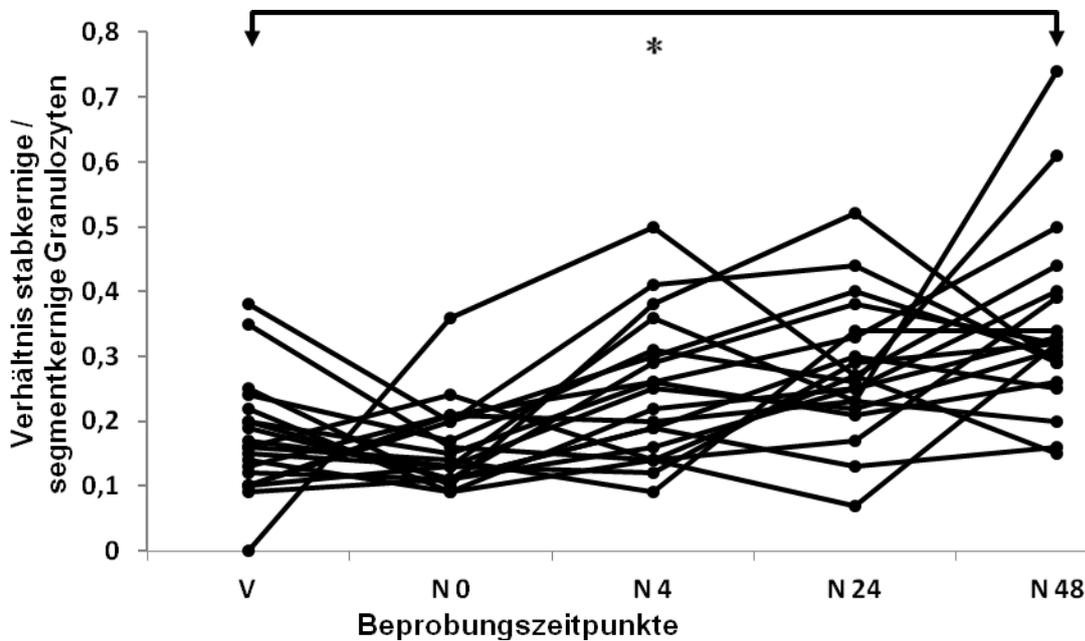


Abbildung 25: Das Verhältnis der stabkernigen/segmentkernigen neutrophilen Granulozyten im Blut zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten ( $n=20$ ). Ein \* bezeichnet einen signifikanten ( $p \leq 0,05$ ) Unterschied zwischen den Beprobungszeitpunkten.

Nach 48 Stunden erreichten die Werte mit einem Median von 0,32 ( $Q_1 = 0,27 / Q_3 = 0,40$ ) (im Mittel  $0,34 \pm 0,32$ ) 103,60 % des Ruheniveaus und waren damit signifikant ( $p \leq 0,05$ ) verändert, im Vergleich zu den Ausgangswerten.

Das Verhältnis der stabkernigen/segmentkernigen neutrophilen Granulozyten ist in Tabelle 14 im Anhang angegeben und in Abbildung 25 dargestellt.

#### 4.2.4 Hämatokrit und Gesamteiweiß

Der Median des Hämatokritwertes zeigt einen signifikanten ( $p \leq 0,05$ ) Anstieg von 36,5 % ( $Q_1 = 34 / Q_3 = 38$ ) vor, auf 45 % ( $Q_1 = 39,25 / Q_3 = 47$ ) nach der Belastung. Abbildung 26 zeigt den Hämatokritwert zu den Beprobungszeitpunkten.

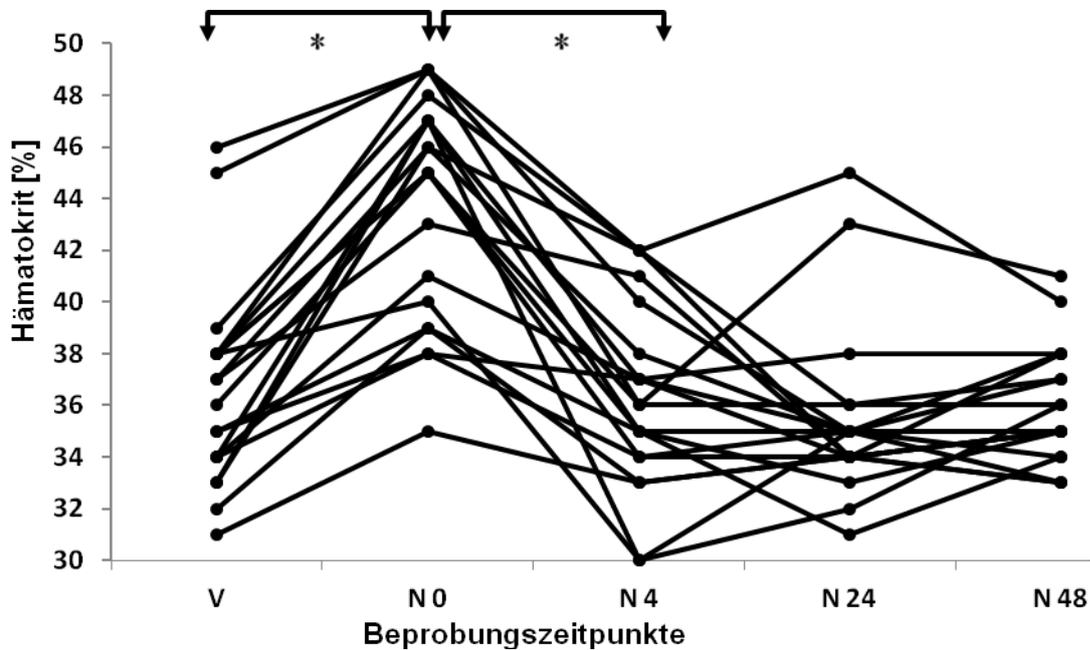


Abbildung 26: Der Hämatokritwert zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten [%] (n=20). Ein \* bezeichnet einen signifikanten ( $p \leq 0,05$ ) Unterschied zwischen den Beprobungszeitpunkten.

Die TP-Konzentration stieg nach der Belastung von einem Medianwert von 49,94 mg/ml ( $Q_1 = 46,27 / Q_3 = 53,70$ ) vor dem Training auf 52,39 mg/ml ( $Q_1 = 48,04 / Q_3 = 54,98$ ) an, und erreichte einen Wert von 52,80 mg/ml ( $Q_1 = 49,48 / Q_3 = 55,77$ ) nach 4 Stunden. Der Anstieg der TP im Vergleich zu den Ausgangswerten beträgt maximal 6 % (N 4). Tabelle 15 im Anhang gibt die Werte der TP-Konzentration und des Hämatokrits über den Versuchszeitraum an.

#### 4.2.5 Erythrozyten

Der Gehalt an RBB lag vor der Belastung bei 8,69 Tera (T)/l ( $Q_1 = 8,00 / Q_3 = 9,77$ ). Es zeigte sich ein signifikanter ( $p \leq 0,05$ ) Anstieg durch das Training. Zum Zeitpunkt N 0, nach der Belastung, lagen die Medianwerte bei 10,80 T/l ( $Q_1 = 10,16 / Q_3 = 11,54$ ). Die Konzentration der Erythrozyten ist in Abbildung 27 dargestellt.

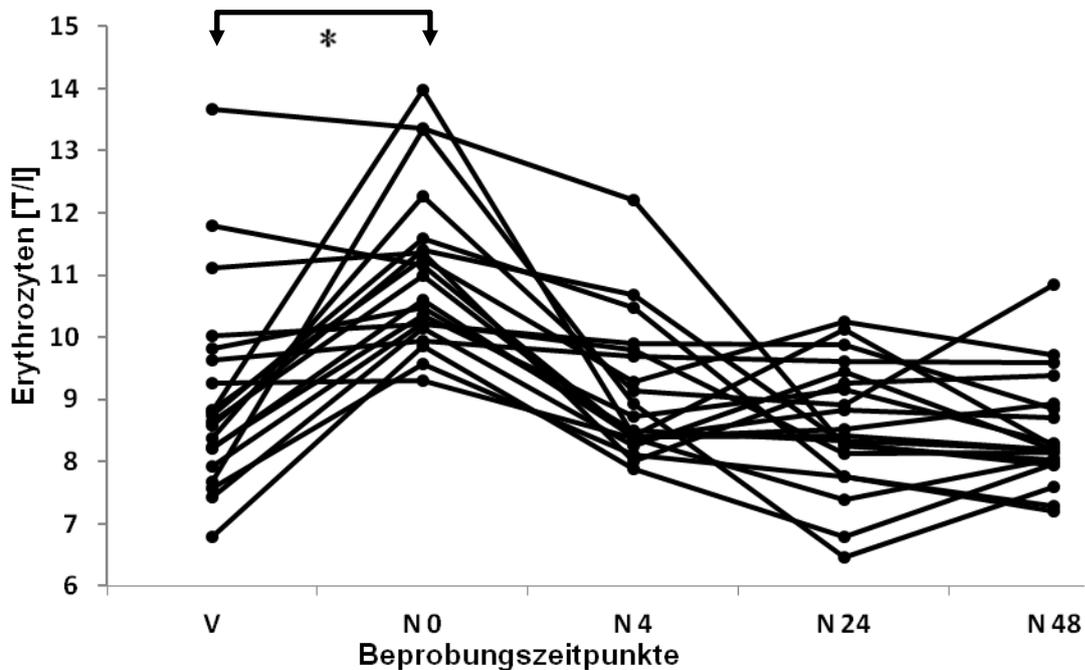


Abbildung 27: Der Erythrozytengehalt zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten [T/l] ( $n=20$ ). Ein \* bezeichnet einen signifikanten ( $p \leq 0,05$ ) Unterschied zwischen den Beprobungszeitpunkten.

Nach 48 Stunden lag der Medianwert mit 8,10 T/l ( $Q_1 = 7,98 / Q_3 = 8,92$ ) am niedrigsten. Tabelle 16 im Anhang gibt den Erythrozytengehalt und den Hämoglobingehalt zu den verschiedenen Messzeitpunkten wieder.

## 4.3 Myeloperoxidase im Serum

### 4.3.1 Myeloperoxidase-Aktivität

Der Anstieg der MPO-Aktivität betrug zum Zeitpunkt N 0, direkt nach Belastung 357 % des Ausgangsmedianwertes von 0,48 U/ml ( $Q_1 = 0,24 / Q_3 = 0,82$ ) (im Mittel  $0,56 \pm 0,41$  U/ml).

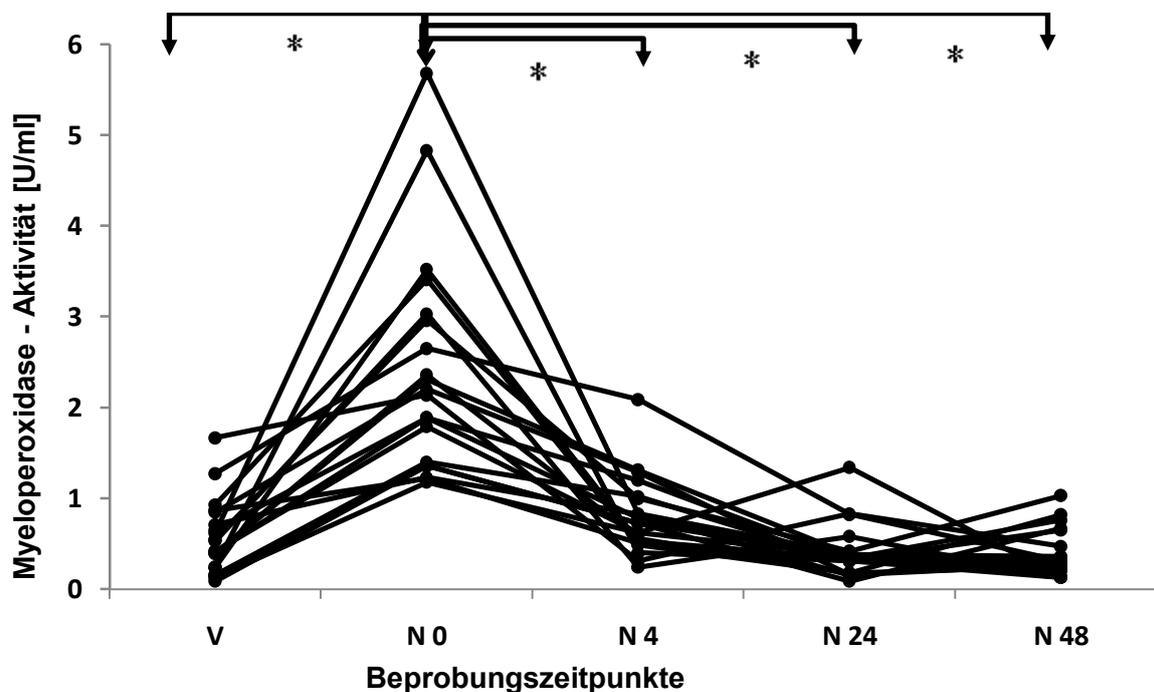


Abbildung 28: Die Myeloperoxidase-Aktivität im Serum zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten [U/ml] (n=20). Ein \* bezeichnet einen signifikanten ( $p \leq 0,05$ ) Unterschied zwischen den Beprobungszeitpunkten.

Der Medianwert betrug zum Zeitpunkt N 0 2,17 U/ml ( $Q_1 = 1,37 / Q_3 = 3,01$ ) (im Mittel  $2,42 \pm 1,22$  U/ml). Die Zunahme der Aktivität nach Belastung (N 0) erwies sich als statistisch signifikant, verglichen mit allen anderen Beprobungszeitpunkten ( $p \leq 0,05$ ).

Der Median lag nach 24 Stunden bei 0,34 U/ml ( $Q_1 = 0,21 / Q_3 = 0,41$ ) (im Mittel  $0,39 \pm 0,26$  U/ml).

Abbildung 28 gibt die MPO-Aktivität im Serum wieder.

In Tabelle 8 im Anhang sind die Werte der MPO-Aktivität zu den verschiedenen Beprobungszeitpunkten angegeben.

### 4.3.2 Peroxidaseaktivität im Serum

Die eingesetzte Messmethode erlaubt neben der spezifischen Bestimmung der MPO-Aktivität auch eine Berechnung der gesamten, im Serum vorhandenen, Peroxidaseaktivität. Durch Subtraktion der MPO-Aktivität von der gesamten Peroxidaseaktivität, erhält man die Peroxidaseaktivität im Serum ohne MPO-Aktivität. Die Absorptionenwerte sind in Tabelle 10 im Anhang angegeben.

Der Median der Gesamtserumperoxidaseaktivität im Serum liegt in Ruhe bei 1,78 U/ml ( $Q_1 = 0,75 / Q_3 = 4,48$ ) und erreicht den höchsten Wert nach der Belastung mit 4,23 U/ml ( $Q_1 = 2,56 / Q_3 = 5,19$ ).

Nach 4 und 24 Stunden liegen die Ergebnisse bei 1,25 U/ml ( $Q_1 = 0,95 / Q_3 = 1,90$ ) bzw. 0,67 U/ml ( $Q_1 = 0,44 / Q_3 = 2,56$ ). Nach 48 Stunden erreicht der Medianwert wieder Ausgangsniveau (1,87 U/ml;  $Q_1 = 1,65 / Q_3 = 2,11$ ).

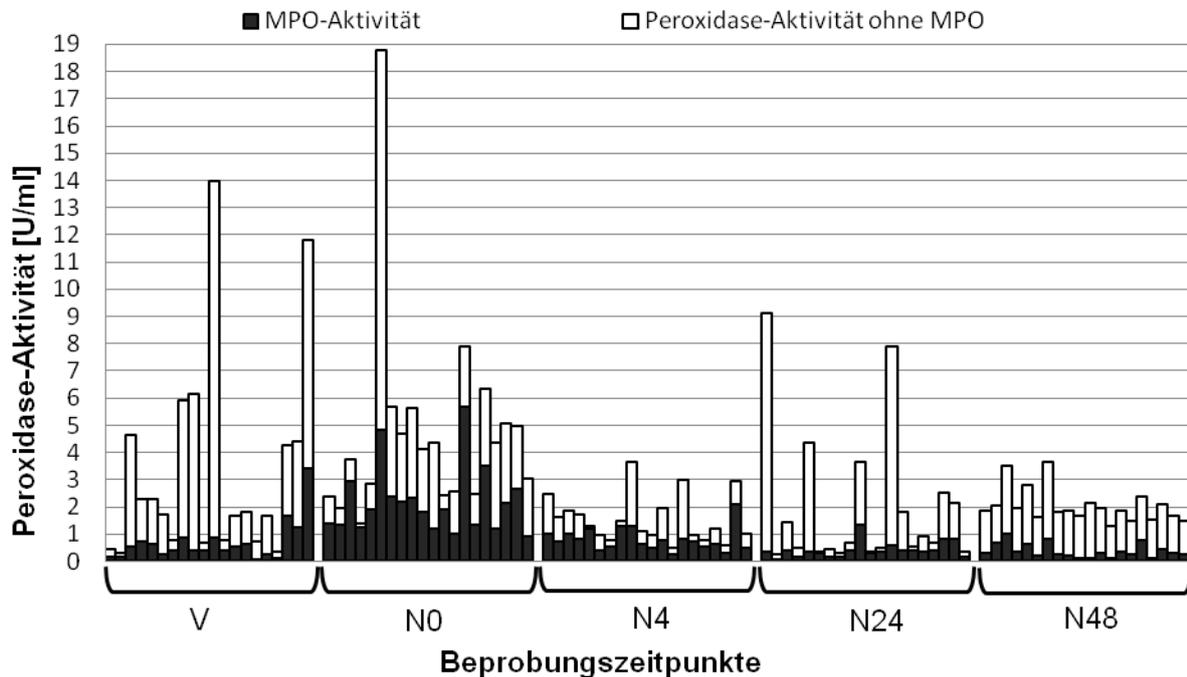


Abbildung 29: Myeloperoxidase-Aktivität und gesamte Peroxidaseaktivität im Serum zu den verschiedenen Beprobungszeitpunkten (n = 20).

Abbildung 29 zeigt die MPO-Aktivität und die Peroxidaseaktivität im Serum ohne MPO.

#### 4.4 Malondialdehyd

Der Gehalt an MDA im Serum stieg nach der Belastung auf im Mittel  $52166 \pm 6796$  fluorimetrische Absorptionseinheiten (RFU). Im Vergleich zu den Ruhewerten ( $45380 \pm 5098$  RFU) war dieser Anstieg signifikant ( $p \leq 0,05$ ).

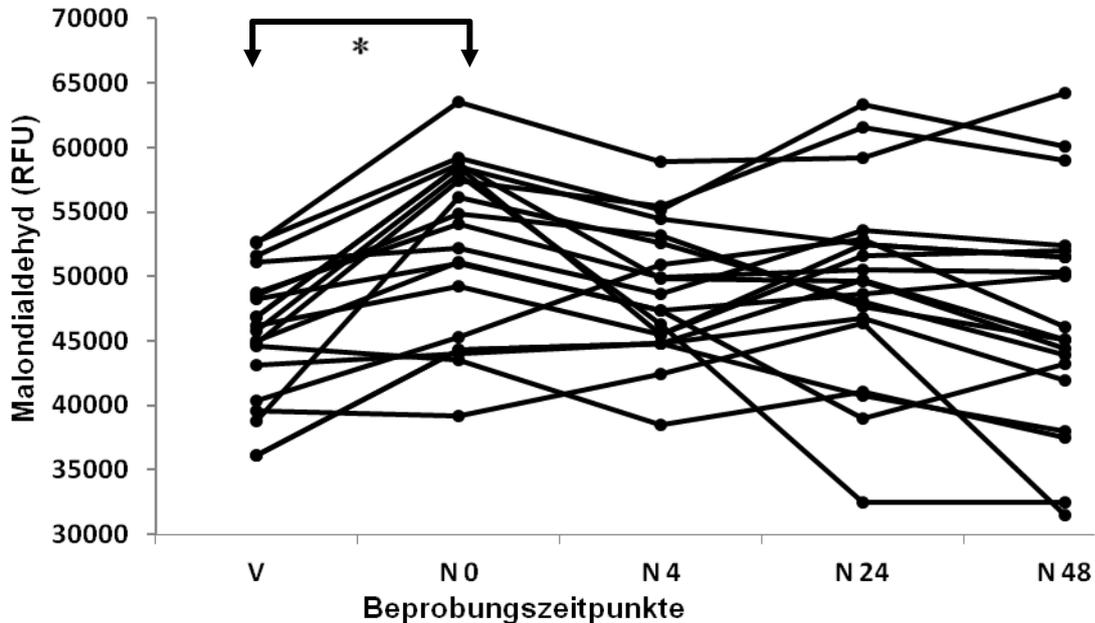


Abbildung 30: Der Gehalt an Malondialdehyd im Serum zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten [RFU] ( $n=20$ ). Ein \* bezeichnet einen signifikanten ( $p \leq 0,05$ ) Unterschied zwischen den Beprobungszeitpunkten.

Abbildung 30 zeigt die Werte der MDA-Konzentration im Serum zu den verschiedenen Messzeitpunkten. In Tabelle 17 im Anhang sind die Werte des MDA angegeben.

Zwischen dem Serumgehalt an MDA und der Konzentration der Erythrozyten im Blut konnte ein positiver Zusammenhang zu den Zeitpunkten V ( $r=0,56$ ) und N 48 ( $r=0,56$ ) festgestellt werden. Die Korrelation erwies sich als statistisch signifikant ( $p \leq 0,05$ ).

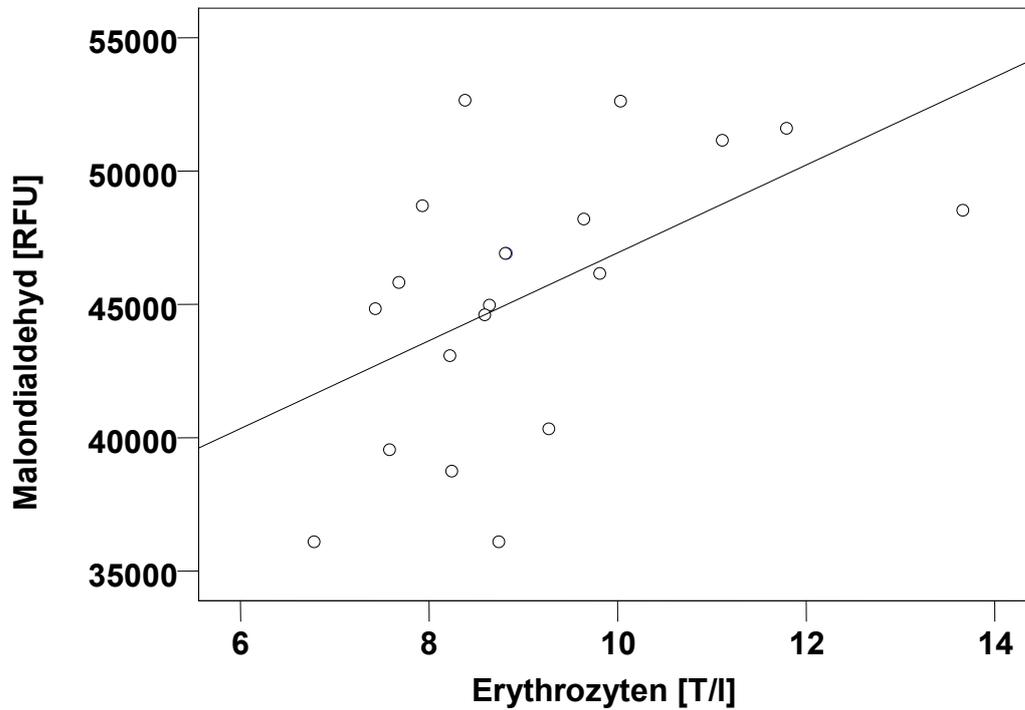


Abbildung 31: Zusammenhang zwischen Malondialdehyd und Erythrozytenzahlen im Serum von 20 Pferden vor der Belastung.

Direkt nach Belastung, sowie vier Stunden nach Belastungsende, konnte kein statistisch abzusichernder Zusammenhang zwischen den beiden Parametern festgestellt werden. Abbildung 31 zeigt die Korrelation der Erythrozyten mit MDA vor der Belastung (V).

## 4.5 Proteingebundene Carbonyle

Der Gehalt der proteingebundenen Carbonyle im Plasma zeigte keine signifikanten Veränderungen. Vor Belastung lag der Median bei 405,50 pmol/mg ( $Q_1 = 344,22 / Q_3 = 450,31$ ). Nach Belastung wurde ein Median von 418,16 pmol/mg ( $Q_1 = 355,24 / Q_3 = 498,45$ ) gemessen. Vier Stunden nach Ende der Belastung lag der Median mit 390,22 pmol/mg ( $Q_1 = 337,62 / Q_3 = 458,87$ ) wieder leicht unter dem Ausgangswert. In Abbildung 32 sind die proteingebundenen Carbonyle graphisch dargestellt.

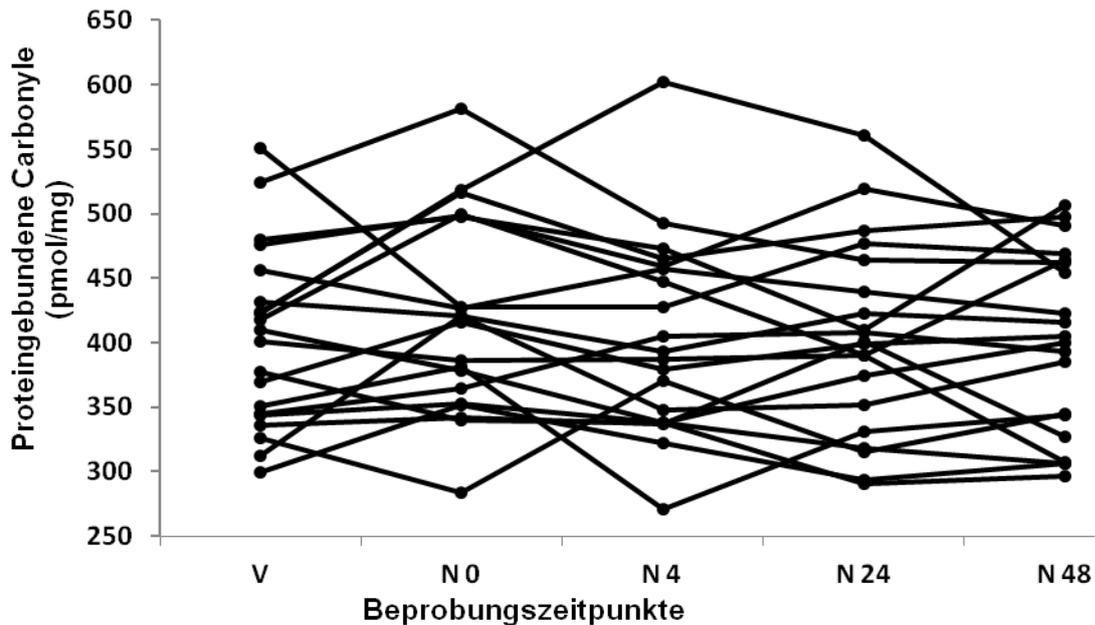


Abbildung 32: Der Gehalt der proteingebundenen Carbonyle zu verschiedenen Beprobungszeitpunkten im Plasma [pmol/mg] (n=20).

Tabelle 18 im Anhang gibt die Werte über den Versuchszeitraum in pmol/mg wieder.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Belastungsintensität

Es wurden verschiedene allgemeine Ansätze entwickelt, um die Ausdauerleistungsfähigkeit bei Sportpferden einschätzen zu können (Couroucé et al., 1999). Diese bedienen sich beispielsweise der HF, der Belastungsdauer, des Laktatwertes und der gelaufenen Geschwindigkeit. Ein standardisierter Belastungstest wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt, da Trainer und Besitzer dem nicht zustimmten. Daher differieren die Eckdaten der einzelnen Tiere. Es wurde mit den jeweiligen Trainern vereinbart, bei hoher Intensität zu trainieren. Die Trainingsintensität sollte die normalen Belastungen der Tiere unter regulären Bedingungen widerspiegeln. Da die Tiere vor dem Training nicht verbracht wurden, können stressbedingte Einflüsse, die zu einer Veränderung des Blutbildes führen können (McGowan, 2008) weitgehend ausgeschlossen werden.

Eine Einschätzung der individuellen Belastungsintensität ist grundsätzlich schwierig und nur mit mehreren Parametern sinnvoll. In dieser Studie wurden HF, Laktatwert, sowie Muskelenzymveränderungen und zelluläre Veränderungen im Blutbild ausgewählt, um eine generelle grobe Einschätzung der systemischen Belastung des Organismus geben zu können (Tyler-McGowan et al., 1999; Couroucé, Chatard & Auvinet, 1997; Erck et al., 2007). Die großen individuellen Unterschiede einiger Parameter (zum Beispiel die Aktivität der MPO) beruhen möglicherweise auf dem uneinheitlichen Pool an Pferden (bezüglich Alter, Geschlecht und Leistungsfähigkeit).

#### 5.1.1 Herzfrequenz

Beim Pferd wird die maximal erreichbare HF unter Belastung mit 210 - 240 S/min angegeben, und ist durch Training nicht beeinflussbar (Evans, 1985). Die maximale HF der Traber lag im Mittel bei  $208,9 \pm 6,2$  S/min, der Median betrug 210 S/min. Da es sich jedoch um ein Intervalltraining handelt, wurden diese Höchstwerte nicht während des gesamten Trainings erreicht, sondern über Zeiträume von 60-90 Sekunden (Abbildung 14 und Abbildung 15). Die HF eines trainierten Pferdes ist bei submaximaler Belastung signifikant geringer, als bei untrainierten Tieren. Die in dieser Studie gemessenen HF-Werte lagen demnach im submaximalen Bereich, erreichten jedoch während der schnellen Trainingsphasen hohe Werte (Rose & Hodgson, 1994).

Fast alle an der Untersuchung teilnehmenden Pferde zeigten im Verlauf des Trainings HF-Werte von über 200 S/min. Eine Belastungsintensität die in einer HF von 200 S/min resultiert, liegt im Bereich der Laktatakkumulation beim Traber (Wilson, Isler & Thornton, 1983), was sich mit den Laktatergebnissen deckt, die eine stattgefundene Laktatakkumulation zeigen.

### 5.1.2 Laktat

Die Laktatproduktion ist ein energieliefernder Prozess des anaeroben Muskelstoffwechsels. Das Ausmaß der Laktatbildung ist abhängig von Dauer und Intensität der Belastung, weist aber individuell und fitnessbedingt sehr hohe Unterschiede auf (Krzywanek, Wittke & Schulz, 1972 b; Krzywanek, 1999; Krzywanek, Schulze & Wittke, 1973).

Es zeigte sich bei allen Probanden ein signifikanter Anstieg des Blutlaktatwertes nach Belastung ( $p \leq 0,05$ ). Die Ruhelaktatwerte (Median 0,93 mmol/l) entsprachen den in der Literatur angegebenen Referenz von  $< 1$  mmol/l beim Pferd (Gill et al., 1987). Direkt nach der Belastung lag der Median bei 6,94 mmol/l und der mittlere Laktatwert bei  $9,60 \pm 6,44$  mmol/l. Die hohe Standardabweichung zeigt eine große individuelle Varianz, die zum einen durch die unvermeidbaren Fitnessunterschiede zu erklären ist, da die Tiere nicht alle die gleiche Leistungsklasse hatten. Außerdem war das Training als Intervalltraining durchgeführt, wobei zwischen anaerober Belastungs- und aeroben Entspannungsphasen gewechselt wurde. Zwar waren alle Pferde über Monate im Training und auf Renn-Niveau, jedoch von unterschiedlicher physischer Leistungsfähigkeit, was die Laktatproduktion beeinflusst (Krzywanek, Schulze & Wittke, 1974). Auch die Anforderungen an die einzelnen Tiere sind im Laufe einer Rennsaison unterschiedlich. Demnach wurden einige Tiere öfter zu Rennen geschickt, sowie in den Rennen unterschiedlich stark belastet. Zudem nahmen fünf verschiedene Trainer an der Untersuchung teil, was Unterschiede in der allgemeinen Trainingsintensität bedeutet. Das drückt sich darin aus, dass Pferde gleichen Alters bei identischen Anforderungen (gleiche Laufristanz und Laufgeschwindigkeiten) zum Teil erhebliche Unterschiede im Laktatwert aufwiesen (bis 5 mmol/l). Ein Zusammenhang zwischen Alter und Laktatwert konnte nicht festgestellt werden.

Die Trainingsbelastung lag erwartungsgemäß im anaeroben Bereich. Definitionsgemäß wird das Überschreiten eines Laktatwertes von 4 mmol/l als aerob/anaerobe Schwelle angesehen (Couroucé, Chatard & Auvinet, 1997; Ferraz et al., 2008).

Da die Tiere jedoch im Mittel keine Werte aufwiesen, die in der Literatur als Maximalwerte (nach Rennen) beschrieben wurden, lag die Belastung unterhalb einer Belastung zur vollständigen Erschöpfung. Für verschiedene Sportarten konnten Maximalwerte von 30 - 40 mmol/l für das Pferd gemessen werden (Marlin et al., 1995). Die höchsten Werte wurden nach Military-Prüfungen festgestellt (Bayly, Grant & Pearsson, 1987).

### 5.1.3 Serumentzyme

Das zelluläre Enzym CK kommt normalerweise nur in geringen Mengen extrazellulär vor. Seine Blutkonzentration erhöht sich jedoch nach zellulären Schäden (Nekrosen) am Muskel, oder bei erhöhter Durchlässigkeit der Zellmembranen, wie sie infolge starker physischer Belastungen entsteht (Snow, Ricketts & Mason, 1983; Valberg et al., 1989).

Obwohl die untersuchten Traber mindestens zwei Tage vor Untersuchungsbeginn kein intensives Training absolvierten, liegen die Ruhewerte der CK mit einem Medianwert von 249 U/l deutlich über den in der Literatur angegebenen Werten von  $< 90$  U/l (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 1982). Da es sich jedoch um Tiere handelt, die regelmäßig hoch belastet werden, ist dieser Wert wahrscheinlich bedingt durch die regelmäßigen Trainingseinheiten beziehungsweise Rennen (Flaschini & Trombetta, 2001).

Nach Belastung steigen die CK-Werte der Traber auf einen Median von 319,5 U/l (im Mittel  $323,36 \pm 73,58$  U/l), und zeigen, dass es durch die Belastung zu Zellschäden gekommen ist. Keines der Tiere zeigte CK-Erhöhungen in Bereichen von über 10.000 U/l, die auf eine akute Myopathie schließen lassen (siehe Tabelle 19 und Tabelle 20 im Anhang für Referenzwerte der CK und AST). Die stärkste Erhöhung zeigte sich 4 Stunden nach Belastung, mit einem

Median von 320 U/l (im Mittel  $330,86 \pm 71,94$  U/l). Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien, die die höchsten Werte ebenfalls mit einigen Stunden Verzögerung nachweisen konnten (Valberg et al., 1989; Frankiewicz-Jozko, Faff & Sieradzan-Gabelska, 1996). Nach 24 Stunden erreichten die Werte wieder Ruhenniveau.

Die AST, die eine grundsätzlich längere Halbwertszeit hat, als die CK (Glitz, 1997), zeigt bei einem Probanden schon in Ruhe einen deutlich erhöhten Wert (688 U/l). Da die CK jedoch gleichzeitig keine Erhöhung aufwies, ist davon auszugehen, dass der hohe AST-Wert auf einen länger zurückliegenden Zellschaden hindeutet. Eine Leberproblematik als Ursache wurde durch Bestimmung der GGT ausgeschlossen, da dieser Wert mit 20,6 U/l im Referenzbereich lag. Nach Belastung zeigte die AST dieses Pferdes keine stärkere Erhöhung, als die der anderen Tiere.

Der Median der AST der Probanden in Ruhe betrug 325 U/l (im Mittel  $352 \pm 83$  U/l) und liegt damit, wie der CK-Wert über den in der Literatur angegebenen Ruhewerten von 90 bis 240 U/l (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 1982; Schäfer, 1999). Die AST zeigt höchste Werte in der ersten Probe nach Belastungsende mit einem Medianwert von 361 U/l. Der Medianwert betrug 48 Stunden nach Belastung noch 344 U/l (im Mittel  $370,7 \pm 114$  U/l). Sommer und Kollegen (1982) fanden eine Normalisierung der AST-Aktivität ebenfalls erst nach dem dritten Tag nach Belastung (Sommer, Szemes & Felbinger, 1982). Dies belegt den dauerhaften Einfluss eines intensiven Trainings auf diesen Blutparameter.

Die LDH als nicht muskelspezifisches Enzym zeigt einen signifikanten Anstieg nach Belastung. Auch in diesem Fall liegen die Ruhewerte leicht über den in der Literatur angegebenen Referenzwerten von  $< 400$  U/l (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 1982). Der Mittelwert liegt in Ruhe bei  $433 \pm 110$  U/l und erreicht nach der Belastung  $491 \pm 112$  U/l. Nach 48 Stunden sind die Ruhewerte geringgradig unterschritten ( $394 \pm 95$  U/l). Dies kann als Anhaltspunkt gesehen werden, dass nicht nur Zellen der Muskulatur geschädigt wurden, sondern auch andere Zellen durch die physische Belastung Schaden nehmen (Belcastro et al., 1996).

Da keines der gemessenen Enzyme pathologische Veränderungen (im Sinne eines massiv überschrittenen Referenzwertes (Tabelle 19 und Tabelle 20 im Anhang) nach Belastung zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass es nicht zu übermäßigen Muskelschäden durch das Training gekommen ist.

## 5.2 Blutbildveränderungen

In dieser Untersuchung wurden die Veränderungen der weißen Blutzellen durch Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl, des Anteils neutrophiler Granulozyten, sowie durch Veränderungen im N/L-Verhältnis und in der Zunahme der juvenilen Granulozyten beschrieben. Durch die Speicherung in den Granula der Neutrophilen, ist die MPO eng mit der Kinetik dieser Zellen verbunden, konnte aber in früheren Untersuchungen nicht grundsätzlich mit ihrer Anzahl korreliert werden (Art et al., 2006 b). Nach einer kurzen, intensiven Belastung fanden Art und Kollegen keine Korrelation, die jedoch nach einer Ausdauerbelastung sichtbar war. Art und Kollegen beziehen sich auf die Plasmakonzentration der MPO.

Trabbelastung für 15 Minuten auf einem schrägen Laufband wurde in einer Untersuchung von Rose und Kollegen mit erhöhten totalen Werten an Leukozyten und neutrophilen Granulozyten assoziiert, und mit einer Abnahme der Lymphozytenzahl. Die Werte waren schon eine Stunde nach Belastung wieder auf Ruhenniveau (Rose et al., 1983).

Die vorliegende Belastung führte zu deutlich länger andauernden Veränderungen der Leukozytenzahlen, die nach 48 Stunden im Mittel noch leicht oberhalb der Ausgangswerte lagen. Es wurden bei einigen Pferde Erhöhungen oberhalb der physiologischen Grenze von

> 10 G/l gefunden. Dies ist auf die kortisolbedingte Rekrutierung von Leukozyten bei Belastung zurückzuführen und nicht als pathologischer Wert zu interpretieren (Snow, 1983). Die neutrophilen Granulozyten wiesen nach 4 Stunden mit einem Anstieg von 32 % die höchsten Werte und einen signifikanten Anstieg im Vergleich zum Ruhewert auf.

Das N/L-Verhältnis zeigt vom Beprobungszeitpunkt vor Trainingsbeginn bis 4 Stunden nach Trainingsende einen Anstieg von 1,12 auf 2,32 (im Mittel  $0,23 \pm 0,5$  auf  $2,3 \pm 0,8$ ), was einer Erhöhung des Median um 100 % entspricht. *Ex vivo* ließ sich nicht nachweisen, dass degranulierte Leukozyten zugrunde gehen (Prasad, Chaudhary & Kalra, 1991). Die Zunahme an stabkernigen Neutrophilen, die auf eine verstärkte Produktion bzw. Freisetzung juveniler Zellen hindeutet, ist demzufolge eine Konsequenz aus der Migration der adulten Zellen aus dem Blutstrom ins Gewebe und spricht für eine zelluläre Aktivierung im Rahmen einer Immunreaktion.

Die Aktivierung neutrophiler Granulozyten geht mit einem Anstieg ihres Sauerstoffverbrauchs einher. Dieser Umstand hat die Produktion von ROS und die Freisetzung proteolytischer Enzyme sowie der MPO zur Folge. Neben Veränderungen der Konzentration werden die Leukozyten durch Belastung demnach auch in ihrem Aktivitätszustand beeinflusst. Einige Studien sehen nach Belastung eine erhöhte Aktivität der Leukozyten bezogen auf die ROS-Bildungskapazität (Jensen-Waern et al., 1999; Donovan et al., 2007), während ihre maximale Aktivierbarkeit durch chemische Stimulation [zum Beispiel mit Phorbol Myristat Acetat (PMA)] oft über einen gewissen Zeitraum (bis 72 Stunden) herabgesetzt ist (Donovan et al., 2007; Prasad, Chaudhary & Kalra, 1991). Moderate Belastung scheint die Funktion der Leukozyten nicht zu beeinflussen (Escribano et al., 2005).

Trainierte Pferde haben einen basal erhöhten Sauerstoffmetabolismus der sich in Folge von akuter Belastung weiter verstärkt und zu oxidativem Stress führen kann (Krumrych, 2009; Escribano et al., 2005). Das antioxidative System unterliegt jedoch ebenfalls trainingsbedingten Veränderungen (Smith & Pyne, 1997) und trainierte Individuen sind nachweislich weniger anfällig für oxidativen Stress (Frankiewicz-Jozko, Faff & Sieradzian-Gabelska, 1996).

Veränderungen des N/L-Verhältnisses sind ein weiterer Beleg für die deutlichen Reaktionen des weißen Blutbildes. Das N/L-Verhältnis zeigt nach 4 Stunden eine Erhöhung des Medianwertes um 100 %, was durch die Neutrophilie und die Abnahme der Leukozytenzahl bedingt ist. Die deutliche Neutrophilie ist als Hauptursache zu sehen, was mit den Ergebnissen von Wong et al. übereinstimmt. Sie fanden nach 6 Stunden eine Zunahme des N/L-Verhältnisses (von 1,8 auf 2,6) (Wong, Smith & Thong, 1992).

Eine frühere Studie von Duarte und Kollegen zeigte 1993, dass durch ein Fehlen der Leukozyten im Gewebe langfristig (nach einer Zeitspanne von 48 Stunden) ein erhöhter ROS-Gehalt entsteht, was die Bedeutsamkeit der aktivierten Leukozyten nach Belastung im oxidativen Gleichgewicht belegt. Durch Hemmung der Leukozyten kam es zwar zu geringeren Zellschäden im Gewebe, gleichzeitig wurde keinerlei Regenerationstendenz beobachtet (Duarte et al., 1993).

Die Veränderungen im leukozytären Blutbild der Traber deuten auf eine Aktivierung des zellulären immunologischen Systems durch Belastung hin. Ob dies langfristig zu einer verbesserten Infektabwehr führt, oder ob primär pathologische Konsequenzen überwiegen ist noch nicht abschließend untersucht (Nieman, 2000; Robson, Alston & Myburgh, 2003; Chouker et al., 2005).

### 5.3 Myeloperoxidase

Bezüglich der zugrunde liegenden Fragestellung dieser Studie, zeigt die MPO-Aktivität direkt nach Belastung die größte Steigerung. Eine schnelle Reaktion der MPO-Aktivität durch Aktivierung fanden auch Franck und Kollegen (2009) in einer *ex vivo* Studie. Sie stellten außerdem einen Unterschied zwischen der MPO-Konzentration und der MPO-Aktivität fest. Nach Stimulation isolierter Pferdeleukozyten mit PMA wurde eine große Menge MPO frei, die jedoch zu 95 % inaktiv war. Dagegen führte die Stimulation mit N-Formylmethionyl-Lencyl-Phenylalanin (fMLP) zu einer deutlich geringeren MPO-Freisetzung, während aber ein höherer Anteil der MPO aktiv war (Franck et al., 2009). Demnach können MPO-Konzentrationsveränderungen und Aktivitätsmessungen zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen.

Signifikante Erhöhungen der MPO-Konzentration konnten mit dem von Franck et al. entwickelten ELISA-Test (Franck et al., 2005) sowohl bei strangulierenden, ischämischen Obstruktionen des Dünndarms (Grulke et al., 2008), als auch in verschiedenen Geweben bei experimentell induzierter akuter Hufrehe festgestellt werden (Riggs et al., 2007). Diese Resultate belegen die Aussagekraft der MPO als Marker einer Aktivierung der Leukozyten im Rahmen einer Entzündungsreaktion. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass Belastung bereits sehr schnell zu einer Aktivierung der MPO führen kann, was wahrscheinlich mit der Aktivierung der Leukozyten in Verbindung steht.

Erste Untersuchungen zur MPO-Konzentration nach Belastung im Plasma beim Pferd (Art et al., 2006 b) zeigten eine deutliche Steigerung der MPO-Konzentration im Plasma 30 min nach Belastung. Die Studie von Art und Kollegen (2006) wurde nach Leistungswettbewerben auf internationalem Niveau (Ausdauertritt über 160 km und Geländespringpferdeprüfung) durchgeführt. Auch spätere Untersuchungen zeigten signifikant erhöhte MPO-Konzentration im Plasma nach ähnlich hohen Belastungen (Lejeune et al., 2010; Serteyn et al., 2010). Dabei lag die Belastung der Tiere sowohl physisch, als auch psychisch deutlich oberhalb der dieser Studien zugrunde liegenden Trainingsbelastung auf der heimatischen Trainingsbahn.

Die vorliegende Untersuchung sieht die MPO bei 16 der 20 Pferde vier Stunden nach Belastung noch zum Teil deutlich erhöht (siehe Tabelle 8), verglichen mit den Ruhewerten vor dem Training. Aufgrund der hohen individuellen Varianz ist die Erhöhung jedoch nicht statistisch signifikant. Untersuchungen zur MPO-Konzentration im Plasma nach Belastung beim Pferd zeigten zwei Stunden nach Belastungsende noch signifikant erhöhte Werte (Lejeune et al., 2010; Serteyn et al., 2010). Eine Probenentnahme in kürzeren Zeitintervallen wäre hier für zukünftige Studien von Interesse.

Edwards und Kollegen (1987) zeigten anhand von Untersuchungen an isolierten humanen Leukozyten, dass die Aktivität der MPO bereits eine Minute nach Aktivierung der Zellen ihren Maximalwert erreichte, danach aber innerhalb von wenigen Minuten rapide absank, so dass nach 10 Minuten nur noch 5 % der gesamten Aktivität messbar war (Edwards, Nurcombe & Hart, 1987).

Da es durch die körperliche Anstrengung zu einer signifikanten Zunahme der neutrophilen Granulozyten, kommt und diese als vermehrt aktiviert angenommen werden können, könnten zum Beispiel die Produkte des „*respiratory burst*“ zur Inaktivierung der MPO beitragen (Edwards, Nurcombe & Hart, 1987). Ein anderer Mechanismus der Inaktivierung ist der Übergang des Enzyms in den Zustand III (Abbildung 6), der dauerhaft zu einer Inaktivierung führt und durch Reaktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Singulett-Sauerstoff entsteht (Edwards, Nurcombe & Hart, 1987). Beides sind ROS, die im Rahmen des belastungsinduzierten oxidativen Stresses entstehen. Sie könnten daher an der Inaktivierung beteiligt sein.

Klinke (2009) beschreibt in ihrer Untersuchung außerdem eine Akkumulation der MPO im Gefäßendothel und im subendothelialen Raum. Es ist möglich, dass ein gewisser Teil an MPO aus dem Blutstrom an der Gefäßwand adhärent ist, oder ins Gewebe gelangt und

somit nicht mehr im Blut messbar ist. Franck und Kollegen (2010) fanden in Muskelproben von sieben belasteten Pferden (nach 120 km Ausdauerrennen) jedoch nur bei drei der untersuchten Tiere deutliche MPO-Anstiege in der Muskulatur. Die anderen vier Pferde wiesen keine erhöhten Werte auf. Die erhöhten MPO-Werte gingen mit deutlich erhöhten CK-Gehalten im Plasma einher, was auf eine pathologische Zellschädigung schließen lässt. Frühere Studien wiesen dagegen auch generell deutliche Veränderungen der MPO in verschiedenen Geweben nach (Belcastro et al., 1996; Morozov et al., 2006). Da in der vorliegenden Studie keine Gewebeproben entnommen wurden, können über die Konzentration oder den Aktivierungsgrad der MPO im Gewebe keine Aussagen gemacht werden.

Die MPO-Aktivität zeigt (besonders direkt nach Belastung) eine relativ große individuelle Varianz zwischen den Probanden. Diese Beobachtung machten auch Lejeune und Kollegen (2010) und Serteyn und Kollegen (2010) bei MPO-Konzentrationsmessungen im Plasma. Es ist davon auszugehen, dass sich die individuell unterschiedlich starke Entzündungsantwort nach Belastung durch hohe Varianzen der MPO zeigt. Auch ein standardisiertes Belastungsprotokoll würde in diesem Fall die Varianz der Ergebnisse nicht verringern.

Die Werte der MPO-Aktivität in dieser Untersuchung lagen zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden nach der Trainingseinheit leicht (nicht signifikant) unterhalb der Ausgangswerte, die vor der Belastung ermittelt wurden. Eine Erklärung könnte eine verminderte Aktivierbarkeit der Leukozyten sein. Untersuchungen zur Veränderung der Leukozyten-Aktivität beim Pferd zeigen, dass es durchaus über einen Zeitraum von 24 - 48 Stunden nach einer intensiven Belastung zu einer Beeinträchtigung der Leukozyten-Aktivität kommt (Donovan et al., 2007). Ein anderer Erklärungsansatz wäre ein leicht erhöhter Ausgangswert durch Aufregung/Nervosität vor der Trainingseinheit. Bei ihren Untersuchungen fanden Deby-Dupont und Kollegen (1998) jedoch keine Veränderungen des MPO-Gehaltes im Plasma durch Aufregung (Transport) der Tiere. Daher ist der Einfluss solcher äußeren Faktoren fraglich. Bei der vorliegenden Untersuchung wurde zudem darauf geachtet, die Probenentnahme vor dem Training bereits in der Box durchzuführen und den Stress für die Tiere gering zu halten.

Weitere Studien zum Verhalten der MPO-Aktivität über einen Zeitraum von 48 Stunden oder länger könnten Einblicke in das langfristige Verhalten der MPO nach Belastung geben.

Das dauerhafte Training der untersuchten Traber, spielt ebenfalls eine Rolle wenn man das Ausmaß der Veränderung der MPO untersucht. Durch Training kommt es bekanntermaßen zu einer Verminderung der immunologischen Antwort auf einen Belastungsreiz (Krumrych, 2009). Diese Tatsache zeigte sich auch anhand von vergleichenden MPO-Messungen trainierter und untrainierter Ratten (Morozov et al., 2006).

Bei untrainierten Pferden führt eine moderate und eine hohe Belastung zu einer erhöhten Aktivität der Phagozytose und des „*respiratory burst*“, nach Stimulation der Leukozyten *ex vivo*. Ein Training über 17 Wochen führte zu basal herabgesetzten Zellfunktionen und einer geringeren Beeinträchtigung durch Belastung. Je intensiver das Trainingsregime in dieser Zeit gewählt wurde, desto stärker sank die Aktivität der Zellen. Als Messmethode wurde Durchflusssyztometrie und als Stimulans PMA benutzt (Raidal et al., 2000).

Eine weitere Zielsetzung dieser Studie war die Klärung der Fragestellung, ob es eine Verbindung zwischen der MPO-Aktivität und Endprodukten oxidativer Schäden an Lipiden und Proteinen gibt, die sich im Blut feststellen lässt. Eine messbare Beteiligung der aktiven MPO (über gebildetes HOCl) an der Entstehung von oxidativen Schäden an Lipiden und Proteinen konnte jedoch in dieser Feldstudie nicht nachgewiesen werden. Naheliegender ist die Vermutung, dass die rasche Inaktivierung der MPO zu keiner deutlichen Produktion von ROS geführt hat.

In der vorliegenden Studie zeigt die MPO keine signifikante Korrelation mit den Parametern für Zellschäden (CK, AST, LDH), Laktat, oder den neutrophilen Granulozyten. Eine Korrelation der MPO-Konzentration mit der CK wurde beim Pferd zwar nach Ausdauerbelastung (120-160 km), nicht aber nach einer kürzeren Belastung beobachtet (Lejeune et al., 2010; Serteyn et al., 2010).

Die Dauer der Belastung hatte auch bei den Untersuchungen von Art und Kollegen (2006) maßgeblichen Einfluss auf den Plasmagehalt an MPO nach einem 160 km langen Ausdauertritt. Die Konzentration von aktivierten neutrophilen Granulozyten korrelierte nur nach dem Distanztritt mit der MPO. Nach einer kürzeren, intensiven Belastung, wie auch in dieser Studie, konnte kein Zusammenhang zwischen MPO und dem Anstieg der neutrophilen Granulozytenzahl festgestellt werden (Art et al., 2006 b). Es ist denkbar, dass sich ein Zusammenhang zwischen MPO und anderen Parametern (zum Beispiel CK, MDA oder oxidierten Proteinen) erst nach langanhaltenden Belastungen zeigt.

Nach Belastung nimmt die Peroxidaseaktivität im Serum gegenüber den Ausgangswerten zu. Diese Zunahme beruht hauptsächlich auf der Erhöhung der MPO. Außerdem oxidiert unter anderem auch  $H_2O_2$  O-Dianisidine und wird bekanntermaßen durch Belastung vermehrt gebildet. Verstärkend kann freiwerdendes Hämoglobin oder Myoglobin aus Erythrozyten oder Muskelzellen wirken, da es zusammen mit  $H_2O_2$  zur Oxidierung von O-Dianisidin führen und somit die Peroxidaseaktivität im Serum steigern kann (Wei, Hong & Kui, 2005). Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass Hämoglobin direkt nach Belastung die höchsten Werte erreicht (Median 17,9 g/dl). Durch die Fähigkeit von eisenhaltigen Proteinen wie Hämoglobin und Myoglobin oxidativen Stress zu verstärken (Kapitel 2.3.1), liegt ein Zusammenhang zwischen Hämoglobinkonzentration und Gesamtperoxidaseaktivität nach Belastung nahe. Auch andere Peroxidasen (wie die eosinophile Peroxidase) könnten zur Veränderung der Serumperoxidaseaktivität beitragen.

In einer aktuellen Studie gelang es Ceusters und Kollegen (2012) equine Myoblasten zu kultivieren. Die Messung der ROS-Produktion dieser Zellen nach Anoxie und Reoxygenierung konnte durch MPO deutlich verstärkt werden. Ein solcher Versuchsaufbau könnte neue Möglichkeiten zur Untersuchung der Auswirkungen von Belastung auf Muskelzellen beim Pferd eröffnen.

## 5.4 Malondialdehyd

Die Bestimmung der Thiobarbitursäure-reaktiven-Substanzen (TBARS) gilt als einer der am häufigsten eingesetzten Indikatoren für oxidative Schäden (Kanter, Lesmes & Kaminsky, 1988; Salminen & Vihko, 1983). Unter den TBARS stellt MDA den Hauptreaktionspartner der Thiobarbitursäure dar. Malondialdehyd ist ein Endprodukt der Lipidperoxidation, das ausschließlich aus mehrfach ungesättigten FS entsteht (Abbildung 13).

Die Konzentration von MDA wird als Maß für die stattgefunden Lipidperoxidation eingesetzt. Die Begriffe TBARS und MDA werden häufig synonym benutzt, obwohl die nachgewiesenen TBARS nicht grundsätzlich mit MDA gleichzusetzen sind, da MDA nur ein möglicher Reaktionspartner ist. Ein Radikalangriff auf Fette resultiert außerdem nicht zwangsläufig in der Bildung von MDA. Zudem können auch andere Reaktionen außer einem Radikalangriff zur Bildung solcher TBARS führen. Aufgrund des in dieser Studie vorliegenden Studiendesigns, bei dem eine intensive körperliche Belastung zwischen zwei relativ nah hintereinander durchgeführten Beprobungen stattfand, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass der Anstieg des MDA ein direktes Resultat der Belastung ist.

Der signifikante Anstieg des MDA nach der Belastung ( $P \leq 0,05$ ) weist auf das Vorhandensein freier Radikale hin, die zu oxidativen Schäden geführt haben. Durch Untersuchungen an Ratten konnte in Gewebeproben eine Abhängigkeit der MDA-Entstehung von der Belastungsintensität nachgewiesen werden (Alessio, Goldfarb & Cutter, 1988). Ferner wird durch regelmäßiges Training eine Reduktion der MDA-Entstehung erreicht (Alessio & Goldfarb, 1988). Obwohl sich die Traber alle in regelmäßigem Training befunden haben, zeigt sich eine deutliche MDA-Zunahme, die vermuten lässt, dass die akute Belastung durch das Training zu oxidativem Stress geführt hat.

Auch 48 Stunden nach Ende der Belastung liegen Median und Mittelwert noch über dem Ausgangsniveau, sind jedoch nicht signifikant erhöht. Nach moderater Belastung wiesen frühere Untersuchungen an Trabrennpferden, nach 24 Stunden ebenfalls noch einen erhöhten Gehalt an oxidierten Lipiden nach (Kinnunen et al., 2005 b).

Ein Zusammenhang zwischen aktiver MPO und MDA konnte anhand von Einzelkorrelationen nicht festgestellt werden. Sowohl MPO, als auch MDA zeigten jedoch nach Belastung den höchsten Median und Mittelwert.

Die signifikante Korrelation der Erythrozyten mit den MDA Werten vor und nach der Belastung weist dagegen auf einen Zusammenhang zwischen diesen Parametern hin, und unterstreicht die Empfänglichkeit der Membranlipide gegenüber ROS (Koster & Slee, 1983). Die RBB (beziehungsweise das darin enthaltene Hämoglobin) transportieren den Sauerstoff zu den Zellen und sind daher besonders zum Erbringen körperlicher Leistungen unverzichtbar. Beim Menschen konnten künstlich erzeugte Erhöhungen der Hämoglobinkonzentration und Korrelationen zu Ausdauer, Geschwindigkeit und Kraftentwicklung festgestellt werden (Calbet, Lundby & Koskolou, 2006).

Die Sensibilität der Erythrozyten auf belastungsinduzierte Radikale äußert sich in Schäden der Plasmamembran, die zur Veränderung von Membranfluidität und -permeabilität führen (Michelson & Durosay, 1977). Durch Belastung kommt es außerdem zu einer erhöhten Körpertemperatur und einem erniedrigten Blut-pH-Wert, was die Fragilität der RBB erhöht (Hanzawa et al., 1999). Freiwerdendes Hämoglobin aus solchermaßen geschädigten Erythrozyten, kann (genauso wie Myoglobin) aufgrund seiner Sauerstoffbindungskapazität selbst zur Verstärkung des oxidativen Stresses beitragen (Reeder et al., 2002).

Durch Training lassen sich beim Pferd Veränderungen der RBB feststellen, die mit der Leistungsfähigkeit korrelieren (Persson, 1968). In Ruhe findet man jedoch eine hohe individuelle Streuung, da die RBB grundsätzlich im Zirkulationssystem ungleich verteilt sind und der Grad der Speicherung in der Milz variiert. Diese Speicherung kann beim Pferd bis zu 50 % des roten Blutzellvolumens betragen (Snow, 1983). Während der Belastung werden diese RBB durch Milzkontraktion frei und können das Blutvolumen stark beeinflussen (Wood & Fedde, 1997).

Die signifikante Zunahme des Medians der Erythrozytenzahlen direkt nach der Belastung zeigt (wie auch der Anstieg des Hämatokritwertes), dass es durch die Trainingsbelastung zu einer Milzkontraktion gekommen ist, was die Intensität der Belastung unterstreicht. Die Ruhewerte liegen mit einem Mittel von  $9,06 \pm 1,6$  T/l im Referenzbereich (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 1982).

## 5.5 Proteingebundene Carbonyle

Der Nachweis von Carbonylgruppen in oxidierten Proteinen ist eine häufig eingesetzte Technik um oxidative Proteinschäden zu untersuchen (Davis, 1999; Davis, 1987). Dennoch spiegelt das Auftreten dieser Gruppen eher eine globale Änderung im Protein wieder. Daher eignet sich die Bestimmung des Carbonylierungsgrades zwar gut für einen Vergleich von zu

verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Proben untereinander, lässt sich jedoch durch die verschiedenen Entstehungsmöglichkeiten nicht einer speziellen ROS zuordnen.

Die Entstehung von Carbonylkomponenten beruht auf einer Veränderung der Aminosäureseitenketten und stellt daher wieder nur einen Anteil aller oxidativen Schäden dar. Dennoch kann sie zur Einschätzung der Stärke der Schädigung sinnvoll sein. Durch die Bestimmung von 3-Chlorotyrosin lassen sich zwar die Wirkungen der MPO-generierten HOCl spezifisch nachweisen, hätten aber keinen Überblick über die Gesamtschäden gegeben. Die vielfältigen Reaktionsmöglichkeiten von Radikalen mit verschiedenen Proteinen, lassen eine genaue Einschätzung anhand von einem einzigen Test nicht zu (Dean et al., 1997). Die Bildung von Carbonylen erlaubt aber einen ausreichenden Einblick, um radikalinduzierte Schäden feststellen zu können.

Obwohl diese Nachweismethode eine der am häufigsten eingesetzte Techniken ist, erfolgte die erste Bestimmung der belastungsinduzierten Proteincarbonyle als Parameter für oxidative Schäden beim Pferd erst im Jahre 2005 (Kinnunen et al., 2005). Die geforderte Belastungsintensität sollte hierbei einer eher moderaten Belastung entsprechen und wurde auf einem Laufband absolviert. Die Bestimmung der Proteincarbonyle erfolgte sowohl im Plasma, als auch in Muskelproben, wobei sich zeigte, dass sowohl der Ruhegehalt, als auch der Anstieg nach Belastung im Plasma deutlicher war, als im Gewebe. Der höchste Wert wurde 4 Stunden nach Ende der Belastung erreicht und war auch nach 24 Stunden noch nicht wieder im Ruhebereich (Kinnunen et al., 2005 a).

De Moffarts et al. stellten 2006 nach einer intensiven Belastung ebenfalls über 24 Stunden oxidative Schäden an Proteinen beim Pferd nach. Sie benutzten als Parameter die Bildung von Proteinthiolen (De Moffarts et al., 2006).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen nur einen geringen Anstieg der proteingebundenen Carbonyle durch die Belastung. Bereits nach 4 Stunden liegt der Medianwert wieder auf Ruhenniveau.

Dies kann auf einer schnellen Entfernung aus dem Blutstrom beruhen, oder an einer geringen Bildung liegen. Auch der Trainingszustand hat Auswirkungen auf die Höhe oxidativer Schäden. Duberstein et al. fanden nach Belastung keinen Anstieg des Carbonylierungsgrades beim Pferd. Sie stellten jedoch fest, dass sich die Zusammensetzung der Carbonyle durch die Belastung veränderte. Nach Belastung war kein  $\alpha$ -Aktinin mehr messbar (Duberstein et al., 2009).

Jenkins geht 2000 auf generelle Probleme in Bezug auf eine Messung von oxidativem Stress ein. Das Hauptproblem ist die Instabilität der ROS, die in Bruchteilen von Sekunden reagieren und nur unter Laborbedingungen verlässlich messbar sind. Zum anderen findet im Körper eine schnelle Neutralisierung der ROS und sekundärer reaktiver Substanzen durch ein potentes Schutzsystem statt. Dieses Schutzsystem besteht aus enzymatischen und nicht enzymatischen sogenannten Radikalfängern und ist aufgrund seiner Vielfältigkeit und der schnellen Rückreaktion der Substrate nur schwer einzuschätzen. Jenkins sieht es daher als verlässlicher an, die Endprodukte des Radikalangriffs zu bestimmen. Diese sind beweisend für den stattgefundenen oxidativen Schaden, der allein durch eine Bestimmung von ROS nicht belegt wäre (Jenkins, 2000).

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

### Veränderungen der Myeloperoxidase und weiterer biochemischer und hämatologischer Parameter beim Traber nach Trainingsbelastung im Serum

Die vorliegende Untersuchung sollte dazu dienen einen ersten Einblick in die Veränderungen der Myeloperoxidase (MPO)-Aktivität im Serum von belasteten Trabrennpferden unter Feldbedingungen zu erhalten. Gleichzeitig wurden die Veränderungen mit dem Entstehen von oxidativen Protein- und Lipidschäden, sowie mit dem Auftreten von zellulären Enzymen im Blut, als allgemeine Zellschäden verglichen.

Hierzu wurden 5 Blutproben von 20 gesunden Trabrennpferden vor und nach einer regulären Trainingsbelastung (5 Minuten, 4, 24 und 48 Stunden) genommen. Solche Trainingseinheiten absolvieren die Pferde in der Regel zwei bis dreimal pro Woche. Anhand der Blutproben wurden die Enzyme Kreatin-Kinase, Aspartat-Amino-Transferase und Laktat-Dehydrogenase, sowie Laktat bestimmt. Außerdem wurde jeweils ein Blutbild inklusive eines Zellausstriches angefertigt, um Veränderungen der neutrophilen Granulozyten zu betrachten. Als Parameter für oxidative Zellschäden wurden Malondialdehyd (MDA) und die Zunahme an Proteincarbonylen gemessen.

Zur Einschätzung der physischen Belastung wurde bei den 20 Pferden während des Trainings kontinuierlich Herzfrequenz und Geschwindigkeit, sowie die Trainingsdauer und die gelaufene Distanz protokolliert.

Durch das Training kam es zu einer signifikanten Zunahme der MPO-Aktivität von 0,48 U/l (im Mittel  $0,56 \pm 0,41$  U/ml) auf einen Medianwert von 2,17 U/l (im Mittel  $2,42 \pm 1,22$  U/ml). Vier Stunden nach Ende des Trainings lagen die MPO-Aktivitätswerte nur noch etwa 50 % über den Ruhewerten. Nach 24 und 48 Stunden lagen die Aktivitätswerte unterhalb der Ruhewerte. Der Anstieg der Carbonyle durch das Training erwies sich nicht als statistisch signifikant.

Die MDA-Konzentration im Serum zeigte sich im Mittel signifikant erhöht nach Belastung und belegt das Vorhandensein oxidativer Lipidschäden. Es wurde eine positive Korrelation zwischen dem Gehalt an MDA und Erythrozyten im Ruhezustand und nach 48 Stunden festgestellt.

Die Veränderungen der Leukozyten und Erythrozyten nach Belastung waren genauso signifikant, wie der Anstieg des Laktatwertes und der Serumenzyme, die belastungsbedingte Gewebeschäden anzeigen. Es ließ sich jedoch keine Korrelation mit der MPO-Aktivität feststellen. Der größte Anstieg des MDA war zum Zeitpunkt der größten MPO-Aktivität sichtbar.

Die Zunahme der Zahl stabkerniger neutrophiler Granulozyten gegenüber den segmentkernigen erwies sich nach 48 Stunden ebenfalls als signifikant. Dies deutet auf eine Reaktion des zellulären Immunsystems hin.

Die Ergebnisse zeigen, dass reguläres Training zu deutlichen Veränderungen der MPO im Serum von gesunden Trabrennpferden führt, was ein Zeichen für die Aktivierung des zellulären Immunsystems ist. Gleichzeitig ist es durch die Belastung zu oxidativen Schäden an Lipiden gekommen.

Bei dieser Untersuchung wurde eine deutliche Reaktion des zellulären Immunsystems durch Veränderungen der MPO, sowie Erhöhung der totalen Leukozytenzahl und anschließender Erhöhung der stabkernigen neutrophilen Granulozyten sichtbar.

In zukünftigen Studien wäre eine Messung in kürzeren Zeitintervallen nach Belastung, sowie Vergleiche zwischen Aktivität und Konzentration der MPO von Interesse.

## 7 SUMMARY

### Serum alterations of Myeloperoxidase and other biochemical and hematological parameter of standardbred trotters after training exercise

The present study was performed to observe alterations in myeloperoxidase (MPO)-activity in serum samples obtained from exercised Standardbred trotters under field conditions.

Results were compared with parameters for oxidative damages to proteins and lipids as well as with the increase in cellular enzymes as marker of general tissue damage.

For this reason, 5 blood samples from 20 healthy Standardbred trotters were taken prior and following (5 minutes, 4 hours, 24 hours and 48 hours) a regular training exercise, normally performed twice a week.

The alterations in serum enzymes creatine kinase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase and lactate were measured. In addition, red and white blood cell counts and differentials were determined to observe changes in the subpopulations of neutrophil granulocytes. As parameter for oxidative damage, malondialdehyde (MDA) and carbonylated proteins were determined.

To assess exercise intensity, we recorded continuously heart rate, speed, as well as duration and covered distance for each of the 20 horses.

Exercise resulted in a significant increase in MPO-activity from a median value of 0.48 U/l (mean of  $0.56 \pm 0.41$  U/ml) to 2.17 U/l (mean  $2.42 \pm 1.22$  U/ml). Four hours after termination of training, MPO-activity was only about 50 % above resting values. After 24 and 48 hours MPO-activity was under pre-exercise level. The exercise induced increase of carbonylated proteins was slight and not significant.

Mean MDA-concentration in serum was significantly increased after exercise, showing oxidative damage in lipids. A positive correlation was seen between erythrocyte count and MDA at rest and after 48 hours.

Alterations in leukocyte and erythrocyte numbers were significant after exercise, as were those of lactate and serum enzymes, indicating tissue damage, but no correlation with MPO-activity. However, MDA showed highest values at the same time as MPO-activity.

Increase of juvenile neutrophils was also significant after 48 hours, indicating an activated cellular immune system.

Results demonstrate that regular training exercise leads to considerable alterations in MPO activity in serum of healthy trotters as a result for cellular immunologic reactions as well. Simultaneously, exercise induced oxidative stress occurred in lipids.

We found a considerable reaction of the cellular immune system by changes of MPO, increase in total neutrophils and subsequent rise of juvenile neutrophils.

For further studies it would be of special interest, to observe alterations in MPO-activity in smaller time intervals after exercise as well as comparisons between MPO-activity and concentration.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- AGNER K. (1941):  
Verdoperoxidase, a ferment isolated from leucocytes.  
*Acta Physiol Scand A Suppl* 2 (8), 1-62.
- ALBRICH J.M., MCCARTHY C.A. & HURST J.K. (1981):  
Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for  
microbicidal mechanisms of leukocytes myeloperoxidase.  
*Proc Nat Acad Sci USA* 78 (1), 210-214.
- ALESSIO H.M. & GOLDFARB A.H. (1988):  
Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise:  
adaptive response to training.  
*J Appl Physiol* 64 (4), 1333-1336.
- ALESSIO H.M., GOLDFARB A.H. & CUTTER R.G. (1988):  
MDA content increase in fast- and slow-twitch skeletal muscle with  
intensity of exercise in rat.  
*Am J Physiol* 255 (6), 874-877.
- ALI H., HARIBABU B., RICHARDSON R.M. & SNYDERMAN R. (1997):  
Mechanisms of inflammation and leukocyte activation.  
*Med Clin North Am* 81 (1), 1-28.
- ANDERSON M.G. (1976):  
The effect of exercise on the lactic dehydrogenase and creatin  
kinase isoenzyme composition of horse serum.  
*Res Vet Sci* 20 (2), 191-196.
- ANDREWS P.C., PARNES C. & KRINSKY N.I. (1984):  
Comparison of myeloperoxidase and hemi-myeloperoxidase with  
respect to catalysis, regulation, and bactericidal activity.  
*Arch Biochem Biophys* 228 (2), 439-442.
- ARGIROUDIS S.A., KENT J.E. & BLACKMORE D.J. (1982):  
Observations on the isoenzymes of creatin kinase in equine serum  
and tissues.  
*Equine Vet J* 14 (4), 317-321.
- ART T., FRANCK T., LEKEUX P., MOFFARTS B., DE COUETIL L., BECKER  
M., KOHNEN S., DEBY-DUPONT G. & SERTEYN D. (2006 a):  
Myeloperoxidase concentration in bronchoalveolar lavage fluid from  
healthy horses and those with recurrent airway obstruction.  
*Can J Vet Res* 70 (4), 291-296.
- ART T., GANGL M., VOTION D., KOHNEN S. & SERTEYN D. (2006 b):  
Plasma concentration of myeloperoxidase in endurance and 3-day  
event horses after a competition.  
*Equine Vet J Suppl* 36, 298-302.
- ASHEIM A., KNUDSON O., LINDHOLM A., RÜLCKER C. & SALTIN B. (1970):  
Heart rates and blood lactate concentrations of standardbred

- horses during training and racing.  
J Am Vet Med Assoc 157 (3), 304-312.
- AVELLINI L., CHIARDIA E. & GAITI A. (1999):  
Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some radical scavengers in horses.  
Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 123 (2), 147-154.
- AVELLINI L., SILVESTRELLI M. & GAITI A. (1995):  
Training-induced modifications in some biochemical defences against free radicals in equine erythrocytes.  
Vet Res Comm 19 (3), 179-184.
- BAINTON D.F., ULLYOT J.L. & FARQUHAR M.G. (1971):  
The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. origin and content of azurophil and specific granules.  
J Exp Med 134 (4), 907-934.
- BAKER B., GAFFIN S.L., WELLS M., WESSELS B.C. & BROCK-UTNE J.G. (1988):  
Endotoxaemia in racehorses following exertion.  
J S Afr Vet Assoc 59 (2), 63-66.
- BALOGH N., GAAL T., RIBICZEYNE P.S. & PETRI A. (2001):  
Biochemical and antioxidant changes in plasma and erythrocytes of pentathlon horses before and after exercise.  
Vet Clin Pathol 30 (4), 214-218.
- BAYLY W.M., GRANTL B.D. & PEARSSON R.C. (1987):  
Lactate concentrations in thoroughbred horses following maximal exercise under field conditions.  
In: Equine exercise physiology II. Gillespie J.R., Robinson N.E. (Hrsg.); Davis, California: ICEEP Publications; 426-437.
- BELCASTRO A.N., ARTHUR G.D., ALBISSER T.A. & RAJ D.A. (1996):  
Heart, liver and skeletal muscle myeloperoxidase activity during exercise.  
J Appl Physiol 80 (4), 1331-1335.
- BINDOLI J., RIGOBELLO M.P. & DEEBLE D.J. (1992):  
Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines.  
Free Rad Biol Med 13 (4), 391-405.
- BOFFI F.M., CITTAR J., BALSUKUS G., MURIEL M. & DESMARAS E. (2002):  
Training-induced apoptosis in skeletal muscle.  
Equine Vet J Suppl 34, 275-278.
- BRADFORD M.M. (1976):  
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
Anal Biochem 72, 248-254.

- BRADY P.S., KU P.K. & UILREY D.E. (1978):  
Lack of effect of selenium supplementation on the response of the equine erythrocyte glutathion system and plasma enzymes to exercise.  
J Anim Sci 47 (2), 493-496.
- BRINCKER B. (2004):  
Einsatz von L-Glutamin und seine Wirkung auf den antioxidativen Status bei Galopprennpferden.  
Dissertation; Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Deutschland.
- BUFFON A., BIASUCCI L.M., LIUZZO G., D'ONOFRIO G., CREA F. & MASERI A. (2002):  
Widespread coronary inflammation in unstable angina.  
New England J Med 347 (1), 5-12.
- CALBET J.A., LUNDBY C. & KOSKOLOU M. (2006):  
Importance of hemoglobin concentration to exercise: acute manipulations.  
Respir Physiol Neurobiol 151 (2-3), 132-140.
- CAMUS G., DEBY-DUPONT G., DEBY C., JUCHMES-FERIR A., PINCEMAIL J. & LAMY M. (1993 b):  
Inflammatory response to strenuous muscular exercise in man.  
Mediators Inflamm 2 (5), 335-342.
- CAMUS G., PINCEMAIL J., DEBY-DUPONT G., DEBY C., JUCHMES-FERIR A. & LAMY M. (1993 a):  
Effects of methylprednisolone on exercise-induced increases of plasma levels of polymorphnuclear elastase and myeloperoxidase in man. Preliminary results.  
Mediators Inflamm 2 (4), 323-326.
- CARAKOSTAS M.C., MOORE W.E. & SMITH J.E. (1981):  
Intravascular neutrophilic granulocyte kinetics in horses.  
Am J Vet Res 42 (4), 623-625.
- CARR A.C., BERG J.V.D. & WINTERBOURN C.C. (1996):  
Chlorination of cholesterol in cell membranes by hypochlorous acid.  
Arch Biochem Biophys 332 (1), 63-69.
- CASTRO R., LAMAS J., MORAIS P., SANMARTIN M.L., ORALLO F. & LEIRO J. (2008):  
Resveratrol modulates innate and inflammatory responses in fish leucocytes.  
Vet Immun Immunopathol 126 (1-2), 9-19.
- CAVUSOGLU E., RUWENDE C. & ENG C. (2007):  
Usefulness of baseline plasma myeloperoxidase levels as an independent predictor of myocardial infarction at two years in patients presenting with acute coronary syndrome.  
Am J Cardiol 99 (10), 1364-1368.

- CEUSTERS J.D., MOUITHYS-MICKALAD A.A., DE LA REBIÈRE DE POUYADE G., FRANCK T.J., VOTION D.M., DEBY-DUPONT G.P. & SERTEYN D.A. (2012):  
Assessment of reactive oxygen species production in cultured equine skeletal myoblasts in response to conditions of anoxia followed by reoxygenation with or without exposure to peroxidases.  
*Am J Vet Res* 73 (3), 426-434.
- CHANCE B., SIES H. & BOVERIS A. (1979):  
Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.  
*Physiol Rev* 59 (3), 527-605.
- CHIARDIA E., AVELLINI L., RUECA F., SPATERNA A., PORCIELLO F., ANTONIONI M.T. & GAITI A. (1998):  
Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses.  
*Comp Biochem Physiol B* 119 (4), 833-836.
- CHOUKER A., DEMETZ F., MARTIGNONI A., SMITH L., SETZER F., BAUER A., HOLZL J., PETER K., CHRIST F. & THIEL M. (2005):  
Strenuous physical exercise inhibits granulocyte activation induced by high altitude.  
*J Appl Physiol* 98 (2), 640-647.
- COUROUCÉ A. (1998):  
Endurance and sprint training.  
CESMAS Proceedings, Cordoba, 203-218.
- COUROUCÉ A., CHATARD J.C. & AUVINET B. (1997):  
Estimation of performance potential of standardbred trotters from blood lactate concentrations measured in field conditions.  
*Equine Vet J* 29 (5), 365-369.
- COUROUCÉ A., GEFFROY O., BARREY E., AUVINET B. & ROSE R.J. (1999):  
Comparison of exercise tests in French trotters under training track, racetrack and treadmill conditions.  
*Equine Vet J Suppl* 30, 528-532.
- DANELL SCHWINDT C., ZALDIVART F. & COOPER D. (2008):  
Brief exercise increases circulating myeloperoxidase in boys with maturational influences observed at baseline.  
*FASEB J* 22 (670.20).
- DAVIE A.J. & EVANS D.L. (2000):  
Blood lactate responses to submaximal field exercise tests in thoroughbred horses.  
*Vet J* 159 (3), 252-258.
- DAVIES K.J.A., QUINTANILHA A.T., BROOKS G.A. & PACKET L. (1982):  
Free radicals and tissue damage produced by exercise.  
*Biochem Biophys Res Commun* 107 (4), 1198-1205.
- DAVIS K.J. (1987):  
Stable markers of protein damage and degradation by oxygen

- radicals: general aspects.  
J Biol Chem 262 (20), 9895-9901.
- DAVIS M.J. (1999):  
Stable markers of oxidant damage to proteins and their application  
in the study of human diseases.  
Free Rad Biol 27 (11-12), 1151-1162.
- DE MOFFARTS B. (2005):  
Oxidative stress in competition horses: biochemical markers and  
their nutritional modulation.  
Dissertation; Universität Lüttich, Lüttich, Belgien.
- DE MOFFARTS B., KIRSCHVINK N., ART T., PINCEMAIL J. & LEKEUX P.  
(2006):  
Effect of exercise on blood oxidant/antioxidant markers in  
Standardbred horses: comparison between treadmill and race track  
tests.  
Equine Vet J Suppl 36, 254-257.
- DE MOFFARTS B., KIRSCHVINK N., PINCEMAIL J. & LEKEUX P. (2005):  
Impact physiologique et pathophysiologie du stress oxydant chez le  
cheval.  
Ann Med Vet 149 (1), 1-9.
- DEAN R.T., FU S., STOCKER R. & DAVIES M.J. (1997):  
Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation.  
Biochem J 324 (1), 1-18.
- DEATON M.D., HODGSON D.R., EVANS D.L. & ROSE R.J. (1999):  
Effects of low- and moderate-intensity training on metabolic  
responses to exercise in throughbreds.  
Equine Vet J Suppl 30, 521-527.
- DEATON C.M. & MARLIN D.J. (2003):  
Exercise-associated oxidative stress.  
Clin Tech Equine Prac 2 (3), 278-291.
- DEBY-DUPONT G., GRULKE S., CAUDRON I., MATHY-HARTER M.,  
BENBAREK H., DEBY C., LAMY M. & SERTEYN D. (1998):  
Equine neutrophil myeloperoxidase in plasma: design of a radio-  
immunoassay and first results in septic pathologies.  
Vet Immun Immunopathol 66 (3-4), 257-271.
- DENNIS W.H., OLIVIERI V.P. & KRUSÉ C.W. (1979):  
The reaction of nucleotides with aqueous hypochlorous acid.  
Water Res 13 (4), 357-362.
- DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT (1982):  
Arbeitswerte in der Laboratoriumsdiagnostik beim Pferd.  
Tierärztl Umsch 37, 47-49.
- DI MEO S. & VENDITTI P. (2001):  
Mitochondria in exercise-induced oxidative stress.  
Biol Signals Recept 10 (1-2), 125-140.

- DONOVAN D.C., JACKSON C.A., COLAHAN P.T., NORTON N.N., CLAPPER J.L., MOORE J.N. & HURLEY D.J. (2007):  
Assessment of exercise-induced alterations in neutrophil function in horses.  
Am J Vet Res 68 (11), 1198-1204.
- DUARTE J.A., CARVALHO F., BASTOS M.L., SOARES J.M.C. & APPELL H.-J. (1993):  
Do invading leucocytes contribute to the decrease in glutathion concentrations indicating oxidative stress in exercised muscle, or are they important for its recovery?  
Eur J Appl Physiol Occup Physiol 68 (1), 48-53.
- DUBERSTEIN K.J., JOHNSON S.E., MCDOWELL L.R. & OTT E.A. (2009):  
Protein carbonyl assay to measure oxidative stress in muscle of exercising horses supplemented with vitamin E.  
Comp Exercise Physiol 6 (1), 1-5.
- EDWARDS S.W., NURCOMBE H.L. & HART C.A. (1987):  
Oxidative inactivation of myeloperoxidase released from human neutrophils.  
Biochem J 245 (3), 925-928.
- EHRLEIN H.-J., HÖRNICKE H., ENGELHARDT W.V. & TOLKMITT G. (1973):  
Die Herzschlagfrequenz während standardisierter Belastung als Maß für die Leistungsfähigkeit von Pferden.  
Zbl Vet Med Archiv A 20, 188-208.
- EISERICH J.P., HRISTOVA M., CROSS C.E., JONES A.D., FREEMAN B.A., HALLIWELL B. & VLIET A.V.D. (1998):  
Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils.  
Nature 391 (6665), 393-397.
- ENGELHARDT W.V. (2000):  
Arbeitsphysiologie unter besonderer Berücksichtigung des Pferdeleistungssports.  
In: Physiologie der Haustiere. Engelhardt W.v. & Breves G. (Hrsg.)  
Stuttgart: Enke Verlag.
- ERCK E., VAN VOTION D.M., SERTEYN D. & ART T. (2007):  
Evaluation of oxygen consumption during field exercise tests in standardbred trotters.  
Equine Comp Exercise Physiol 4 (1), 43-49.
- ESCRIBANO B.M., CASTEJON F.M., VIVO R., SANTISTEBAN R., AGÜERA E.L. & RUBIO M.D. (2005):  
Effects of training on phagocytic and oxidative metabolism of peripheral neutrophils in horses exercised in the aerobic-anaerobic transition area.  
Vet Res Commun 29 (2), 149-158.
- EVANS D.L. (1985):  
Cardiovascular adaptations to exercise and training.  
Vet Clin North Am Pract 1 (3), 513-531.

- FENNA R.E., ZENG J. & DAVEY C. (1995):  
Structure of the green heme in myeloperoxidase.  
Arch Biochem Biophys 316 (1), 653-656.
- FERRAZ G.C., DÂNGELIS F.H.F., TEIXEIRA-NETO A.R., FREITAS E.V.,  
LACERDA-NETO J.C. & QUEIROZ-NETO A. (2008):  
Blood lactat threshold reflects glucose responses in horses  
submitted to incremental exercise test.  
Arq Bras Med Vet Zootec 60 (1), 256-259.
- FIETZ S.A. (2008):  
Biomarkers in equine synovial fluid and serum for the diagnosis of  
joint diseases.  
Dissertation; Freie Universität Berlin, Berlin, Deutschland.
- FIETZ S., BONDZION A., MOSCHOS A., HERTSCH B. & EINSPANIER R.  
(2007):  
Measurement of equine myeloperoxidase (MPO) activity in synovial  
fluid by a modified MPO assay and evaluation of joint diseases-An  
initial case study.  
Res Vet Sci 84 (3), 347-353.
- FLASCHINI A. & TROMBETTA M. (2001):  
Modificationss induced by training and diet in some exercise-related  
blood parameters in young trotters.  
J Equine Vet Sci 21 (12) , 601-604.
- FRANCK T., GRULKE S. & DEBY-DUPONT G. (2006):  
A specific method for measurement of equine active  
myeloperoxidase in biological samples in in vitro tests.  
J Vet Diagnostic Invest 18 (4), 326-334.
- FRANCK T., GRULKE S., DEBY-DUPONT G., DUVIVIER C., PETERS F. &  
SERTEYN D. (2005):  
Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for  
specific equine neutrophil myeloperoxidase measurement in blood.  
J Vet Diagnostic Invest 17 (5), 412-419.
- FRANCK T., KOHNEN S., DEBY G., DEBY C., NIESTEN A. & SERTEYN D.  
(2009):  
Activation of equine neutrophils by phorbol myristate acetate or N-  
formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces a different response  
in reactive oxygen species production and release of active  
myeloperoxidase.  
Vet Immunol Immunopathol 130 (3-4), 243-250.
- FRANCK T., VOTION D.M., CEUSTERS J., DE LA REBIÈRE DE POUYADE G.,  
MOUITHYS-MICKALAD A., NIESTEN A., FRAIPONT A., VAN ERCK E.,  
GOACHET A.G., ROBERT C. & SERTEYN D.(2010):  
Specific immuno-extraction followed by enzymatic detection  
(SIEFED) of myeloperoxidase and mitochondrial complex I in  
muscular microbiopsies: preliminary results in endurance horses.  
Equine Vet J Suppl 38, 296-302.

- FRANKIEWICZ-JOZKO A., FAFF J. & SIERADZAN-GABELSKA B. (1996):  
Changes in concentrations of tissue free radical marker and serum creatin kinase during the post-exercise period in rats.  
*Eur J Appl Phys Occ Phys* 74 (5), 470-474.
- FRANKIEWICZ-JOZKO A. & SZARSKA E. (2000):  
Anti-oxidant level to exercise in the blood of endurance horses.  
*Biol Sport* 17, 217-227.
- GAUT J.P., YEH G.C., TRAN H.D., BYUN J., HENDERSON J.P., RICHTER G.M., BRENNAN M.-L., LUSIS A.J., BELAAOUAJ A., HOTCHKISS R.S. & HEINECKE J.W. (2001):  
Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis.  
*PNAS* 98 (21), 11961-11966.
- GERBER H. (1969):  
Serum enzyme determination in equine medicine.  
*Equine Vet J* 1 (3), 129-139.
- GILL J., JABLONSKA E.M., ZIOLKOWSKA S.M. & SZYKULA R. (1987):  
Influence of differential training on some haematological and metabolic indices in sport horses before and after exercise trials.  
*J Vet Med* 34 (8), 609-616.
- GLITZ F. (1997):  
Muskelenzymmuster und Elimination von i.v. applizierten, homologen Muskelenzymen beim Pferd.  
Dissertation; Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland .
- GOTTLIEB-VEDI M., PERSSON S., ERICKSON H. & KORBUTIAK E. (1995):  
Cardiovascular, respiratory and metabolic effects of intervalltraining at VLA 4.  
*Zentralbl Veterinärmed A* 42 (3), 165-175.
- GRÜN E., SCHNEIDER J., PANNDORF H. & PREUß C. (1977):  
Das Verhalten von Serumenzymen bei trainierten Galopprennpferden im Verlaufe von zwei Rennjahren.  
*Mh Vet Med* 32 (22), 866-873.
- GRULKE S., FRANCK T., GANGL M., PETERS F., SALCICCIA A., DEBY-DUPONT G. & SERTEYN D. (2008):  
Myeloperoxidase assay in plasma and peritoneal fluid of horses with gastrointestinal disease.  
*Can J Vet Res* 72 (1), 37-42.
- GUTTERIDGE J.M. & TOEG D. (1982):  
Iron-dependent free radical damage to DNA and deoxyribose. Separation of TBA-reactive intermediates.  
*Int J Biochem* 14 (10), 891-893.
- HALL E.D. & BOSKEN J.M. (2009):  
Measurement of oxygen radicals and lipid peroxidation in neural

- tissues.  
Curr Protoc Neurosci 7 (17), 1-51
- HANZAWA K., KAI M., HIRAGA A. & WATANABE S. (1999):  
Fragility of red cells during exercise is affected by blood pH and temperature.  
Equine Vet J Suppl 30, 610-611.
- HARRIS P. & SNOW D.H. (1988) The effects of high intensity exercise on the plasma concentration of lactate, potassium and other electrolytes.  
Equine Vet J 20 (2), 109-113.
- INAZAWA J., INOUE K., NISHIGAKI H.T.S., TANIWAKI M., MISAWA S. & ABE T. (1989):  
Assignment of the human myeloperoxidase gene (MPO) to bands q21.3 to q23 of chromosome 17.  
Cytogen Cell Genet 50 (2-3), 135-136.
- JENKINS R.R. (2000):  
Exercise and oxidative stress methodology: a critique.  
Am J Clin Nutr Suppl 72 (2), 670-674.
- JENSEN-WAERN M., LINDBERG A., JOHANNISSON A., GRÖNDAHL G., LINDGREN J.A. & ESSEN-GUSTAVSSON B. (1999):  
The effects of an endurance ride on metabolism and neutrophil function.  
Equine Vet J Suppl 30, 605-609.
- Ji L.L. (1999):  
Antioxidants and oxidative stress in exercise.  
Proc Soc Exp Biol Med 222 (3), 283-292.
- JOHANNSSON M.W., PATARROYO M., OBERG F., SIEGBAHN A. & NILSSON K. (1997):  
Myeloperoxidase mediates cell adhesion via the alpha m beta 2 integrin (mac-1, cd11b/cd/18).  
J Cell Sci 110 (9), 1133-1139.
- JOHNSON K.R. & NAUSEEF W.M. (1991):  
Molecular biology of MPO.  
In: Peroxidases in chemistry and biology I. Everse J., Everse K.E. & Grisham M.B. (Hrsg); Boca Ration, Florida (USA): CRC Press; 63-81.
- JUDGE A.R. & DOTT S.L. (2004):  
Xanthin oxidase and activated neutrophils cause oxidative damage to skeletal muscle after contractile claudication.  
Am J Physiol- Heart C 286 (1), H252-256.
- KANTER M.M., LESMES G.R. & KAMINSKY L.A. (1988):  
Serum creatine kinase and lactate dehydrogenase changes following an eighty kilometer race Relationship to lipid peroxidation.  
Eur J Appl Physiol O 57 (1), 60-63.

- KAPPUS H. (1981):  
Lipid peroxidation: Mechanisms, analysis, enzymologie and biological relevance.  
In: Oxidative stress. Sies H. (Hrsg.); New York: Academic Press, S.273-310.
- KEBIR D.E., JOZSEF L., PAN W. & FILEP J.G. (2008):  
Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through cd 11b/ cd 18 integrins and prolongs inflammation.  
Circ Res 103 (4), 352-359.
- KERR M.G. & SNOW D.H. (1983):  
Plasma enzyme activities in endurance horses.  
In: Equine exercise physiology I. Snow, D.H., Persson, S.G.B., & Rose, R.J. (Hrsg.); Cambridge: Granta Editions; 432-440.
- KING C.C., JEFFERSON M.M. & THOMAS E.L. (1997):  
Secretion and inactivation of myeloperoxidase by isolated neutrophils.  
J Leukocyte Biol 61 (3), 293-302.
- KINKADE J.M., PEMBER S.O., BARNES K.C., SHAPIRA R., SPITZNAGEL J.K. & MARTIN L.E. (1983):  
Differential distribution of distinct forms of myeloperoxidase in different azurophilic granule subpopulations from human neutrophils.  
Biochem Biophys Res Comm 114 (1), 296-303.
- KINNUNEN S., HYYPPÄ S., LAPPALAINEN J., OKSALA N., VENOJÄRVI M., NAKAO C., HÄNNINEN O., SEN C.K. & ATALAY M. (2005 a):  
Exercise-induced oxidative stress and muscle stress protein response in trotters.  
Eur J Appl Physiol 93 (4), 496-501.
- KINNUNEN S., HYYPPÄ S., LEHMUSKERO A., OKSALA N., MÄENPÄÄ P., HÄNNINEN O. & ATALAY M. (2005 b):  
Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and exercise-induced oxidative stress in trotters.  
Eur J Appl Physiol 95 (5-6), 550-556.
- KIRSCHVINK N., DE MOFFARTS B., FARNIR F., PINCEMAIL J. & LEKEUX P. (2006):  
Investigation of blood oxidant/antioxidant markers in healthy competition horses of different breeds.  
Equine Vet J Suppl 36, 239-244.
- KIRSCHVINK N., DE MOFFARTS B. & LEKEUX P. (2008):  
The oxidant/antioxidant equilibrium in horses.  
Vet J 177 (2), 178-191.
- KLEBANOFF S.J. (1999):  
Myeloperoxidase.  
Proc Assoc Am Physicians 111 (5), 383-389.

- KLEBANOFF S.J. (2005):  
Myeloperoxidase: friend and foe.  
J Leukocyte Biol 77 (5), 598-625.
- KLINKE A. (2009):  
Bedeutung der Myeloperoxidase für die Migration neutrophiler Granulozyten.  
Dissertation; Universität Hamburg, Hamburg, Deutschland.
- KOHNE S., FRANCK T., VAN ANTWERPEN P., ZOUAOU BOUDJELTIA K., MOUITHYS-MICKALAD A., DEBY C., MOGUILVSKY N., DEBY-DUPONT G., LAMY M. & SERTEYN D. (2007):  
Resveratrol inhibits the activity of equine neutrophil myeloperoxidase by a direct interaction with the enzyme.  
J Agric Food Chem 55 (20), 8080-8087.
- KOPPENOL W.H. (2001):  
The Haber-Weiss cycle-70 years later.  
Redox Report 6 (4), 229-233.
- KORHONEN P.A., LILIUS E.M., HYPPA S., RASANEN L.A. & POSO A.R. (2000):  
Production of reactive oxygen species in neutrophils after repeated bouts of exercise in standardbred trotters.  
J Vet Med Series A 47 (9), 565-573.
- KOSTER J.F. & SLEE E. (1983):  
Lipid peroxidation of human erythrocyte ghosts induced by organic hydroperoxides.  
Biochem Biophys Acta 752 (2), 233-239.
- KRAFT W. & DÜRR U.M. (2005):  
Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.  
6. Auflage; Kraft W. & Dürr U.M. (Hrsg.); Stuttgart: Schattauer GmbH.
- KRUMRYCH W. (2009):  
Effect of physical exercise on oxygen metabolism of neutrophils in horses.  
Bull Vet Inst Pulawy 53 (1), 97-103.
- KRZYWANEK H. (1999):  
Leistungsphysiologie.  
In: Handbuch Pferdepraxis. 2. Auflage; Dietz O. & Huskamp B. (Hrsg.); Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag; 37-64.
- KRZYWANEK H., SCHULZE A. & WITTKE G. (1972 a):  
Das Verhalten einiger Blutparameter bei Trabrennpferden nach definierter Belastung.  
Berl Münch Tierärztl Wochenschr 85 (17), 325-329.
- KRZYWANEK H., SCHULZE A. & WITTKE G. (1973):  
Der Einfluß von Wettkampfbelastung auf einige Blutparameter bei Trabrennpferden.  
Eur J Appl Physiol 31 (2), 127-139.

- KRZYWANEK H., SCHULZE A. & WITTKÉ G. (1974):  
Veränderungen von Blutparametern bei Trabrennpferden durch intermittierende Belastung.  
*Eur J Appl Physiol* 32 (4), 329-340.
- KRZYWANEK H., WITTKÉ G., BAYER A. & BORMANN P. (1970):  
The heart rates of thoroughbred horses during a race.  
*Equine Vet J* 2 (3), 115-117.
- KRZYWANEK H., WITTKÉ G. & SCHULZ A. (1972 b):  
Wirkungen des Trainings auf leistungsabhängige Blutparameter bei Trabrennpferden.  
*Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 90, 89-92.
- KUMAR P., PAI K., PANDEY H.P. & SUNDAR S. (2002):  
NADH-oxidase, NADPH-oxidase and myeloperoxidase activity of visceral leishmaniasis patients.  
*J Med Microbiol* 51 (10), 832-836.
- LAU D., MOLLNAU H., EISERICH J.P., FREEMAN B.A., DAIBER A., GEHLING U.M., BRUMMER J., RUDOLPH V., MUNZEL T., HEITZER T., MEINERTZ T. & BALDUS S. (2004):  
Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with cd11b/cd18 integrins.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 102 (2), 431-436.
- LEAF D.A., KLEINMAN M.T., HAMILTON M. & DEITRICK R.W. (1997):  
The effect of exercise intensity on lipid peroxidation.  
*Med Sci Sports Exerc* 29 (8), 1036-1038.
- LEJEUNE J.P., SANDERSEN C., VOTION D., CAUDRON I., VANDER HEYDEN L., FRANCK T., CEUSTERS J., MOUITHYS-MICKALAD A., NIESTEN A., DE LA REBIÈRE DE POUYADE G. & SERTEYN D. (2010):  
Effect of intensive exercise on plasmatic neutrophil elastase level in eventing and endurance horses.  
*Equine Vet J Suppl* 38, 12-16.
- LEKEUX P., ART T., LINDEN A., DESMECHT D. & AMORY H. (1991):  
Heart rate, haematological and serum biochemical responses to show jumping.  
In: *Equine exercise physiology III*. Persson, S.G.B., Lindholm, A. & Jeffcott, L.B. (Hrsg); Davis, California: ICEEP Publications; 385-390.
- LIN W.T., YANG S.C., TSAI S.C., HUANG C.C. & LEE N.Y. (2006):  
L-Arginin attenuates xanthine oxidase and myeloperoxidase activities in hearts of rats during exhaustive exercise.  
*Br J Nutr* 95 (1), 67-75.
- MARLIN D.J., FENN K., SMITH N., DEATON C.D., ROBERTS C.A., HARRIS P.A., DUNSTER C. & KELLEY F.J. (2002):  
Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise.  
*J Nutr* 132 (6), 1622-1627.

- MARLIN D.J., HARRIS P.A., SCHROTER R.C., HARRIS R.C., ROBERTS C.A., SCOTT C.M., ORME C.E., DUNETT M., DYSON S.J., BARRELET F. & WILLIAMS B. (1995):  
Physiological, metabolic and biochemical responses of horses competing in the speed and endurance phase of a CCI\*\*\*\* 3-day-event.  
*Equine Vet J Suppl* 20, 37-46.
- MATHY-HARTERT M., BOURGEOIS E., GRULKE S., DEBY-DUPONT G., CAUDRON I., DEBY C., LAMY M. & SERTEYN D. (1998):  
Purification of myeloperoxidase from equine polymorphnuclear leucocytes.  
*Can J Vet Res* 62 (2), 127-132.
- MATHY-HARTERT M., DEBY-DUPONT G., MELIN P., LAMY M. & DEBY C. (1996):  
Cultured macrophages acquire a bactericidal activity against *pseudomonas aeruginosa* after incorporation of myeloperoxidase.  
*Experientia* 52 (2), 1-8.
- MCCONNICO R.S., WEINSTOCK D., POSTON M.E. & ROBERTS M.C. (1999):  
Myeloperoxidase activity of the large intestine in an equine model of acute colitis.  
*Am J Vet Res* 60 (7), 807-813.
- MCGOWAN C. (2008):  
Clinical pathology in the racing horse: the role of clinical pathology in assessing fitness and performance in the racehorse.  
*Vet Clin North Am Equine Pract* 24 (2), 405-421.
- MCKENNA S.M. & DAVIES K.J. (1988):  
The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid: possible role in the bactericidal activity of phagocytes.  
*Biochem J* 254 (3), 685-692.
- MICHELSON A. & DUROSAY P. (1977):  
Hemolysis of human erythrocytes activated oxygen species.  
*Photochem Photobiol* 25 (1), 55-63.
- MILLS P.C., SMITH N.C., CASAS I., HARRIS R.C. & MARLIN D.J. (1996):  
Effects of exercise intensity and environmental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse.  
*Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 74 (1-2), 60-66.
- MOROZOV V.I., PRYATKIN S.A., KALINSKI M.I. & ROGOZKIN V.A. (2003):  
Effect of exercise to exhaustion on myeloperoxidase and lysozyme release from blood neutrophils.  
*Eur J Appl Physiol* 89 (3-4), 257-262.
- MOROZOV V.I., TSYPLENKOV P.V., GOLBERG N.D. & KALINSKI M.I. (2006):  
The effects of high-intesity exercise on sceletal muscle neutrophil myeloperoxidase in untrained and trained rats.  
*Eur J Appl Physiol* 97 (6), 716-722.

- NAUSEEF W.M., MCCORMICK S. & GOEDKEN M. (2000):  
Impact of missense mutations on biosynthesis of myeloperoxidase.  
Redox Rep 5 (4), 197-206.
- NAUSEEF W.M., OLSSON I. & ARNLJOTS K. (1988):  
Biosynthesis and processing of myeloperoxidase - a marker for  
myeloid cell differentiation.  
Eur J Haematol 40 (2), 97-110.
- NGUYEN H.X., LUSIS A.J. & TIDBALL J.G. (2005):  
Null mutation of myeloperoxidase in mice prevents mechanical  
activation of neutrophil lysis of muscle cell membranes in vitro and  
in vivo.  
J Physiol 565 (2), 403-413.
- NIEMAN D.C. (2000):  
Is infection risk linked to exercise workload?  
Med Sci Sports Exerc Suppl 32 (7), 406-411.
- NIEMANN D.C. (1997):  
Immune response to heavy exertion.  
J Appl Physiol 82 (5), 1385-1394.
- NIESS A., SOMMER M., SCHLOTZ E., NORTHOFF H., DICKHUTH H. &  
FEHRENBACH E. (2000):  
Expression of the inducible nitric oxide synthase (iNos) in human  
leukocytes: responses to running exercise.  
Med Sci Sports Exerc 32 (7), 1220-1225.
- OBER B. (2000):  
Enzymuntersuchungen bei Trabrennpferden mit Verdacht auf  
latente Equine Rhabdomyolyse (Tying up).  
Dissertation; Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover,  
Deutschland.
- OLSEN R.L. & LITTLE C. (1984):  
Studies on the subunits of human myeloperoxidase.  
Biochem J 222 (3), 701-709.
- PERSSON S.G.B. (1968):  
Blood volume, state of training and working capacity of racehorses.  
Equine Vet J 1 (2), 52-62.
- PHILIPPOU A., BOGDANIS G., MARIDAKI M., HALAPAS A., SOURLA A. &  
KOUTSILIERIS M. (2009):  
Systemic cytokine response following exercise-induced muscle  
damage in humans.  
Clin Chem Lab Med 47 (6), 777-782.
- PINNIX I.B., GUZMAN G.S., BONKOVSKY H.L., ZAKI S.R. & KINKADE J.M.J.  
(1994):  
The post translational processing of myeloperoxidase is regulated  
by the availability of heme.  
Arch Biochem Biophys 312 (2), 447-458.

- PODREZ E.A., ABU-SOUD H.M. & HAZEN S.L. (2000):  
Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis.  
*Free Rad Biol Med* 28 (12), 1717-1725.
- POWERS S.K. & JACKSON M.J. (2008):  
Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact  
on muscle force production.  
*Physiol Rev* 88 (4), 1243-1276.
- PRASAD K., CHAUDHARY A.K. & KALRA J. (1991):  
Oxygen-derived free radicals producing activity and survival of  
activated polymorphnuclear leukocytes.  
*Mol Cell Biochem* 103 (1), 51-62.
- QUIAN M., EATON J.W. & WOLFF S.P. (1997):  
Cyanate-mediated inhibition of neutrophil myeloperoxidase activity.  
*Biochem J* 326 (1), 159-166.
- QUINDRY J.C., STONE W.L., KING J. & BRODER C.E. (2003):  
The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative  
stress.  
*Med Sci Sports Exerc* 35 (7), 1139-1145.
- RAIDAL S.L., LOVE D.N., BAILEY G.D. & ROSE R.J. (2000):  
Effects of single bouts of moderate and high intensity exercise and  
training on equine peripheral blood neutrophil function.  
*Res Vet Sci* 68 (2), 141-146.
- RAJ D.A., BOOKER T.S. & BELCASTRO A.N. (1998):  
Striated muscle calcium-stimulated cystein protease (calpain-like)  
activity promotes myeloperoxidase activity with exercise.  
*Pflügers Arch - Eur J Physiol* 435 (6), 804-809.
- RASERA L., MASSOCO C.O., LANDGRAF R.G. & BACCARIN R.Y.A. (2008):  
Exercise induced apoptosis and necrosis in the synovial fluid cells  
of athletic horses.  
*Braz J Vet Res* 28 (5), 231-236.
- REBIERE G., DE LA FRANCK T., DEBY-DUPONT G., SALCICCIA A., GRULKE  
S., PETERS F. & SERTEYN D. (2008):  
Effects of unfractionated and fractionated heparins on  
myeloperoxidase activity and interactions with endothel cells:  
possible effects on the pathophysiology of equine laminitis.  
*Vet J* 178 (1), 62-69.
- REEDER B.J., SHARPE M.A., KAY A.D., KERR M., MOORE K. & WILSON  
M.T. (2002):  
Toxicity of myoglobin and haemoglobin: oxidative stress in patients  
with rhabdomyolysis and subarachnoid haemorrhage.  
*Biochem Soc Trans* 30 (4), 745-748.
- REEDERS B.J. & WILSON M.T. (2005):  
Hemoglobin and myoglobin associated oxidative stress: from  
molecular mechanisms to disease States.  
*Curr Med Chem* 12 (23), 2741-2751.

- RICHTER B., NIESSNER A., PENKA M., GRDIC M., STRASSER B., ZIEGLER S., ZORN G., MAURER G., SIMEON-RUDOLPH J. & HUBER K. (2005):  
Endurance training reduces circulating asymmetric dimethylarginine and myeloperoxidase levels in persons at risk of coronary events.  
*Thromb Haemost* 94 (6), 1306-1311.
- RIGGS L.M., FRANCK T., MOORE J.N., KRUNKOSKY T.M., HURLEY D.J., PERONI J.F., DE LA REBIERE G. & SERTEYN D.A. (2007):  
Neutrophil myeloperoxidase measurements in Plasma, laminar tissue, and skin of horses given black walnut extract.  
*Am J Vet Res* 68 (1), 81-86.
- ROBSON P.J., ALSTON T.D. & MYBURGH K.H. (2003):  
Prolonged suppression of the innate immun system in the horse following an 80 km endurance race.  
*Equine Vet J* 35 (2), 133-137.
- ROSE R.J., ALLEN J.R., HODGSON D.R. & STEWART J.H. (1983):  
Responses to submaximal treadmill exercise and training in the horse: changes in haematology, arterial blood gas and acid base measurements, plasma biochemical values and heart rate.  
*Vet Rec* 113 (26-27), 612-618.
- ROSE R.J. & HODGSON D.R. (1994):  
Clinical exercise testing.  
In: *The athletic horse*. Hodgson D.R., Rose R.J. & MyGowan C. (Hrsg.); Philadelphia: W.B. Saunders Company; 245-257.
- SALMINEN A. & VIHKO V. (1983):  
Lipid peroxidation in exercise myopathy.  
*Exp Mol Pathol* 38 (3), 380-388.
- SCHÄFER M. (1999):  
Hämatologische und biochemische Parameter des gesunden Pferdes.  
In: *Handbuch Pferdepraxis*; 2.Auflage; Dietz O. & Huskamp B. (Hrsg.); Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag; 1-6.
- SCHMIDL M., FORSTNER D.V. (1985):  
Veterinärmedizinische Laboruntersuchungen für die Diagnose und Verlaufskontrolle.  
3. Auflage. Schmidl M. & Forstner D.v. (Hrsg); Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim.
- SERTEYN D., GRULKE S., FRANCK T., MOUITHYS-MICKALAD A. & DEBY-DUPONT G. (2003):  
La myeloperoxidase des neutrophiles, une enzyme de defense aux capacites oxydantes.  
*Ann Med Vet* 147 (2), 79-93.
- SERTEYN D., SANDERSEN C., LEJEUNE J.P., DE LA REBIÈRE DE POUYADE G., CEUSTERS J., MOUITHYS-MICKALAD A., NIESTEN A., FRAIPONT A., VAN ERCK E., GOACHET A.G., ROBERT A.G., LECLERC J.L., VOTION D.M. & FRANCK T. (2010):  
Effect of a 120 km endurance race on plasma and muscular

- neutrophil elastase and myeloperoxidase concentrations in horses.  
*Equine Vet J Suppl* 38, 275-279.
- SHIH J., DATWEYLER S.A., HSU S.C., MATIAS M.S., PACENTI D.P.,  
LUEDERS C., MUELLER C., DANNE O. & MÖCKEL M. (2008):  
Effect of collection tube type and preanalytical handling on  
myeloperoxidase concentration.  
*Clin Chem* 54 (6), 1076-1079.
- SHI M., WANG X., YAMANAKA T., OGITA F., NAKATANI K. & TAKEUCHI T.  
(2007):  
Effects of aerobic exercise and anaerobic exercise on biomarkers of  
oxidative stress.  
*Environ Health Prev Med* 12 (5), 202-208.
- SLOET M.M. & GOERING L.S. (2000):  
Muskel und Muskelerkrankungen beim Pferd.  
*Pferdeheilkunde* 16, 394-404.
- SMITH J.A. & PYNE D.B. (1997):  
Exercise, training, and neutrophil function.  
*Exerc Immunol Rev* 3, 96-116.
- SNOW D.H. (1983):  
Physiological factors affecting resting haematology.  
In: *Equine exercise physiology I*. Snow D.H., Persson S.G.B. &  
Rose R.J. (Hrsg.); Cambridge: Granta Editions, 318-323.
- SNOW D.H., RICKETTS S.W. & MASON D.K. (1983):  
Hämatological response to racing and training exercise in  
thoroughbred horses, with partiular reference to the leucocyte  
response.  
*Equine Vet J* 15 (2), 149-154.
- SOFFLER C. (2007):  
Oxidative stress.  
*Vet Clin North Am Equine Pract* 23 (1), 135-157.
- SOMMER H., SZEMES A. & FELBINGER U. (1982):  
Einfluß der Rennbelastung auf die Aktivität verschiedener Enzyme  
und den Gehalt einiger Metaboliten im Blutserum von Galoppfern.  
*Tierärztl Umsch* 37, 751-759.
- THOMAS E.L. (1979):  
Myeloperoxidase, hydrogen peroxide, chloride antimicrobial system:  
Nitrogen-chlorine derivatives of bacterial components in bactericidal  
action against escherichia coli.  
*Infect Immun* 23, 522-531.
- THORNTON J., ESSEN-GUSTAVSSON B., LINDHOLM A., MCMIKEN D. &  
PERSSON S.G.B. (1983):  
Effects of training and detraining on oxygen uptake, cardiac output,  
blood gas tension, pH and lactate concentration during and after  
exercise in the horse.

- In: Equine exercise physiology I; Snow D.H., Persson S.G.B. & Rose R.J. (Hrsg.); Cambridge: Granta Editions, 470-486.
- TIIDUS P.M., ZAJCHOWSKI S., ENNS D., HOLDEN D., BOMBARDIER E. & BELCASTRO A.N. (2002):  
Differential effect of oestrogen on post-exercise cardiac muscle myeloperoxidase and calpain activities in female rats.  
*Acta Phys Scand* 174 (2), 131-136.
- TYLER-MCGOWAN C.M., GOLLAND L.C., EVANS D.L., HODGSON D.R. & ROSE R.J. (1999):  
Haematology and biochemical responses to training and overtraining.  
*Equine Vet J Suppl* 30, 621-625.
- VALBERG S.J., CARLSON G.H., CARDINET II G.H., BIRKS E.K., JONES J.H., CHOMYN A. & DIMAURO S. (1994):  
Skeletal muscle mitochondrial myopathy as a cause of exercise intolerance in a horse.  
*Muscle Nerve* 17 (3), 305-312.
- VALBERG S.J., CARLSSON G.P., CARDINET G.H., BIRKS E.K., JONES J.H., CHOMYN J.H. & DIMAURO S. (1994):  
Skeletal muscle mitochondrial myopathy as a cause of exercise intolerance in a horse.  
*Muscle Nerve* 17, 305-312.
- VALBERG S.J., GUSTAVSSON B.E., LINDHOLM A. & PERSSON S.G. (1989):  
Blood chemistry and skeletal muscle metabolic responses during and after different speeds of trotting.  
*Equine Vet J* 21 (2), 91-95.
- VALBERG S.J., JÖNSSON L., LINDHOLM A. & HOLMGREN N. (1993):  
Muscle histopathology and plasma aspartate aminotransferase, creatine kinase and myoglobin changes with exercise in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis.  
*Equine Vet J* 25 (1), 11-16.
- VISSERS M.C., STERN A., KUYPERS F., BERG J.V.D. & WINTERBOURN C.C. (1994):  
Membrane changes associated with lysis of red blood cells by hypochlorous acid.  
*Free Rad Biol Med* 16 (6), 703-712.
- VISSERS M.C. & THOMAS C. (1997):  
Hypochlorous acid disrupts the adhesive properties of subendothelial matrix.  
*Free Rad Biol Med* 23 (3), 401-411.
- VITA J.A., BRENNAN M.L., GOKCE N., MANN S.A., GOORMASTIC M., SHISHEBOR M.H., PENN M.S., KEANEY J. & HAZEN S.C. (2004):  
Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans.  
*Circulation* 110 (9), 1134-1139.

- WAGNER P.D. (1989):  
Mechanism of exercise-induced hypoxemia in horses.  
J Appl Physiol 66 (3), 1227-1233.
- WEI S., HONG J. & KUI J. (2005):  
Electrochemical determination of hydrogen peroxide using o-dianisidine as substrate and hemoglobin as catalyst.  
J Chem Sci 117 (4), 317-322.
- WHITE A., ESTRADA M., WALKER K., WISNIA P., FILGUEIRA G., VALDES F., ARANEDA O., BEHN C. & MARTINEZ R. (2001):  
Role of exercise and ascorbate on plasma antioxidant capacity in thoroughbred racehorses.  
Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 128 (1), 99-104.
- WILLIAMS C.A., KRONFELD D.S., HESS T.M., SAKER K.E., WALDRON J.E., CRANDELL K.M. & HARRIS P.A. (2005):  
Comparison of oxidative stress and antioxidant status in endurance horses in three 80-km races.  
Equine Comp Exercise Physiol 2 (3), 153-157.
- WILLIAMS C.A., KRONFELD D.S., HESS T.M., SAKER K.E., WALDRON J.N., CRANDELL K.M., HOFFMAN R.M. & HARRIS P.A. (2004):  
Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race.  
J Anim Sci 82 (2), 588-594.
- WILSON R.G., ISLER R.B. & THORNTON J.R. (1983):  
Heart rate, lactic acid production and speed during a standardized exercise test in standardbred horses.  
In: Equine exercise physiology I; Snow D.H., Persson S.G.B. & Rose R.J. (Hrsg.); Cambridge: Granta Editions, 487-496.
- WINTERBOURN C.C. (1985):  
Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride, and similarity to the oxidant to hypochlorite.  
Biochem Biophys Acta 840 (2), 204-210.
- WINTERBOURN C.C. (1986):  
Myeloperoxidase as an effective inhibitor of hydroxyl radical production. Implications for the oxidative reactions of neutrophils.  
J Clin Invest 78 (2), 545-550.
- WINTER J., ILBERT M., GRAF P.C., OZCELIK D. & JAKOB U. (2008):  
Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein folding.  
Cell 135 (4), 691-701.
- WONG C.W., SMITH S.E. & THONG Y.H. (1992):  
Effects of exercise stress on various immune functions in the horse.  
Am J Vet Res 42 (4), 1414-1417.
- WOOD S.C. & FEDDE M.R. (1997):  
Effects of racing and gender on viscoelastic properties of horse

blood.  
Resp Physiol 107 (2), 165-172.

WOODS A.A., LINTON S.M. & DAVIES M.J. (2003):  
Detection of HOCL-mediated protein oxidation products in the  
extracellular matrix of human atherosclerotic plaques.  
Biochem J 370 (2), 729-735.

ZAKI S.R., AUSTIN G.E., CHAN W.C., CONATY A.L., TRUSLER S.,  
TRAPPIER S., LINDSEY R.B. & SWAN D.C. (1990):  
Chromosomal localization of the human myeloperoxidase gene by  
in situ hybridization using oligonucleotide probes.  
Genes Chromosomes Cancer 2 (4), 266-270.

ZHANG C., REITER C., EISERICH J.P., BOERSMAN B., PARKS D.A.,  
BECKMAN J.S., BARNES S. & KIRK C.R. (2001):  
L-Arginin chlorination products inhibit endothelial nitric oxide  
production.  
J Biol Chem 276 (29), 27159-27165.

ZUO L. (2005):  
Reactive oxygen species formation in the transition to hypoxia in  
skeletal muscle.  
Am J Physiol Cell Physiol 289 (2), 207-216.

## 9 ANHANG

**Tabelle 7: Werte der Laktatkonzentration  
im Blut über einen Zeitraum von 48 Stunden nach Trainingsbelastung beim Traber (n=20) in  
[mmol/l].**

Pferd (Nr.)	V	N 0	N 4	N 24	N 48
1	0,94	2,89	1,45	0,70	0,78
2	1,02	3,10	0,99	0,74	0,76
3	0,90	5,66	1,55	0,99	0,80
4	0,94	5,32	2,00	1,03	0,98
5	1,01	4,85	1,68	1,00	1,01
6	0,90	5,52	1,50	1,01	0,92
7	0,81	4,78	0,93	0,90	0,90
8	0,92	15,90	2,71	0,89	0,88
9	0,97	20,60	1,59	0,87	0,98
10	0,96	5,68	1,01	0,98	0,99
11	0,80	12,60	1,59	0,96	1,02
12	0,78	12,20	1,14	0,95	0,90
13	0,94	8,20	1,45	0,96	0,93
14	0,95	17,40	2,28	0,89	0,90
15	0,92	8,89	1,49	0,95	0,78
16	0,93	4,73	1,27	0,79	0,81
17	0,98	25,90	1,43	0,94	0,92
18	1,04	9,45	1,26	0,99	1,02
19	0,70	14,30	2,01	0,80	0,90
20	0,91	3,38	1,29	0,77	0,96

**Tabelle 8: Werte der Myeloperoxidase-Aktivität  
im Serum über einen Zeitraum von 48 Stunden (n=20) in [U/ml].**

Pferd (Nr.)	V	N 0	N 4	N 24	N 48
1	0,16	1,40	1,02	0,31	0,31
2	0,15	1,36	0,73	0,09	0,67
3	0,55	2,96	1,00	0,42	1,03
4	0,71	1,23	0,82	0,15	0,36
5	0,65	1,89	1,20	0,33	0,65
6	0,25	4,83	0,40	0,31	0,22
7	0,40	2,36	0,56	0,18	0,82
8	0,85	2,20	1,29	0,16	0,27
9	0,39	2,31	1,31	0,38	0,20
10	0,42	1,79	0,62	1,34	0,13
11	0,87	1,22	0,51	0,31	0,13
12	0,41	1,89	0,78	0,33	0,31
13	0,53	3,03	0,24	0,58	0,13
14	0,62	5,68	0,83	0,38	0,36
15	0,09	1,36	0,73	0,38	0,27
16	0,24	3,52	0,53	0,34	0,76
17	0,13	1,18	0,62	0,38	0,13
18	1,67	2,14	0,31	0,83	0,47
19	1,27	2,65	2,09	0,82	0,31
20	0,93	3,41	0,49	0,18	0,25

Pferd Nr.	v			N 0			N 4			N 24			N 48		
	CK (U/l)	ASAT (U/l)	LDH (U/l)	CK (U/l)	ASAT (U/l)	LDH (U/l)	CK (U/l)	ASAT (U/l)	LDH (U/l)	CK (U/l)	ASAT (U/l)	LDH (U/l)	CK (U/l)	ASAT (U/l)	LDH (U/l)
1	182	296	393,1	197	320	437,4	236	335	455,3	190	326	319,4	188	300	300,7
2	167	311	296,5	197	321	308,8	225	338	407,3	219	322	451,1	183	313	300,7
3	266	303	440,6	344	362	636,6	337	383	575,2	321	357	558,9	315	372	404,1
4	243	293	410,4	280	300	417,1	227	293	356,7	217	286	319,3	209	280	309,3
5	244	318	581,7	249	320	595,6	245	326	555	234	319	425	235	318	420,7
6	393	327	678,8	494	335	618,9	480	333	622,2	387	327	581,3	324	330	568,4
7	254	355	443,2	274	379	447,1	286	377	444,2	278	359	468,3	240	347	337,3
8	286	370	327,4	415	399	448,7	426	394	421,2	321	378	381,6	225	356	330,9
9	291	321	609,9	346	360	708,3	414	350	760,8	321	343	686,6	280	341	582,5
10	292	404	403,6	359	459	544	306	449	493,7	249	402	442,6	229	397	401,9
11	237	303	372,3	283	313	426,1	308	325	406	251	314	380,4	235	302	309,6
12	224	297	403,4	334	333	533,9	315	325	546,7	277	309	459,6	218	300	420,8
13	193	312	293,9	226	336	342,4	236	335	360,4	225	334	387,5	200	331	277,6
14	219	326	430,1	283	349	494,2	364	352	483,4	233	335	445,5	231	314	431,4
15	242	324	252,1	305	362	312,6	366	371	318,9	220	329	276,3	229	350	262
16	229	408	517,9	297	437	605,4	325	443	591	210	379	480,6	223	479	487,4
17	304	349	503	393	368	573,6	461	367	544,6	318	372	551,7	311	370	519
18	269	383	438	344	403	439,3	298	389	412,2	256	377	330,2	290	443	372,8
19	327	671	509,1	384	754	547	355	603,6	481,6	265	662	490,3	248	806	482,3
20	292	360	350,1	337	391	389,5	369	362	398,2	223	357	387,6	222	364	354,9

**Tabelle 9: Werte der Serumenzyme  
Kreatin-Kinase, Aspartat-Amino-Transferase und Laktat-Dehydrogenase  
über einen Zeitraum von 48 Stunden Trainingsbelastung beim Traber (n=20).**

**Tabelle 10: Werte der Aktivität der Peroxidasen im Serum**  
**Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, und Median. Ergebnisse stellen die Absorptionswerte bei 405 nm dar. (n = 20).**

		Peroxidaseaktivität (ohne MPO) in U/l	Gesamte Peroxidaseaktivität in U/l
V	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	2,64 $\pm$ 3,31	3,33 $\pm$ 3,77
	Median	1,45	1,78
N 0	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	2,54 $\pm$ 2,87	4,73 $\pm$ 3,70
	Median	2,27	4,23
N 4	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	0,74 $\pm$ 0,63	1,54 $\pm$ 0,87
	Median	0,53	1,25
N 24	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	1,53 $\pm$ 2,45	1,94 $\pm$ 2,54
	Median	0,33	0,67
N 48	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	1,65 $\pm$ 0,42	2,04 $\pm$ 0,63
	Median	1,56	1,87

**Tabelle 11: Werte der Leukozytenzahl und der neutrophilen Granulozyten im Serum über einen Zeitraum von 48 Stunden (n=20) in [G/l].**

Leukozyten	Pferd Nr.	V	N 0	N 4	N 24	N 48
	1	5,86	6,07	9,54	6,30	6,84
	2	6,34	8,17	9,48	7,93	6,35
	3	9,03	10,40	10,30	8,10	6,40
	4	7,13	7,96	8,36	7,49	8,19
	5	6,08	7,15	8,11	8,07	7,14
	6	6,65	8,30	9,86	7,97	6,97
	7	7,22	8,01	10,94	8,52	8,51
	8	6,24	6,26	8,55	4,89	5,74
	9	7,60	8,87	11,10	7,70	7,30
	10	6,55	7,98	13,41	10,01	8,80
	11	7,60	10,32	8,50	7,94	7,59
	12	6,55	7,82	10,20	7,97	6,30
	13	7,57	9,19	9,45	7,80	7,70
	14	7,93	8,70	10,64	8,34	8,43
	15	5,85	6,47	8,83	6,62	6,48
	16	7,51	7,33	8,82	8,77	8,89
	17	8,55	8,91	7,70	6,43	6,84
	18	7,15	8,98	8,99	8,82	6,89
	19	4,96	6,64	8,57	6,20	5,08
20	6,86	7,56	7,85	10,87	7,38	

Fortsetzung Tabelle 11: Werte der Leukozytenzahl und der neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten	Pferd Nr.	V	N 0	N 4	N 24	N 48
	1	3,48	3,90	7,22	4,06	4,12
	2	3,03	3,19	4,99	4,19	3,25
	3	3,99	4,53	6,80	3,47	3,82
	4	3,54	3,36	5,66	3,97	3,80
	5	3,21	3,55	5,52	4,68	3,82
	6	3,07	3,24	6,45	4,22	3,39
	7	3,34	3,68	7,39	4,76	4,03
	8	3,15	3,90	4,20	1,90	2,84
	9	3,88	4,40	5,40	3,50	3,39
	10	3,06	4,98	5,99	4,34	3,82
	11	3,52	3,34	4,95	4,01	4,65
	12	2,95	3,76	6,23	4,16	4,03
	13	3,80	3,53	4,40	3,16	4,50
	14	4,49	5,60	7,47	4,81	4,65
	15	3,44	3,47	6,30	3,67	3,82
	16	4,45	4,72	3,64	5,09	5,22
	17	5,51	6,50	5,35	3,75	3,62
	18	3,65	3,22	6,42	4,79	3,83
	19	2,31	3,11	5,92	3,23	2,11
20	3,48	2,50	4,66	7,98	3,92	

Pferd Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
V	Lymphozyten	1,88	3,12	4,48	3,19	2,39	2,91	3,39	2,73	4,49	3,21	3,64	3,30	3,14	2,96	2,03	2,48	2,82	3,26	2,32	2,86
	Monozyten	0,32	0,02	0,29	0,17	0,32	0,52	0,34	0,20	0,23	0,20	0,25	0,16	0,28	0,32	0,29	0,35	0,07	0,11	0,26	0,34
	Eosinophile Granulozyten	0,16	0,15	0,25	0,18	0,15	0,15	0,14	0,15	0,24	0,15	0,17	0,13	0,33	0,14	0,09	0,21	0,14	0,13	0,07	0,13
	Basophile Granulozyten	0,01	0,02	0,03	0,05	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0,00	0,01	0,02	0,01	0,00	0,01
Pferd Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
N 0	Lymphozyten	1,61	4,37	8,61	4,31	3,08	4,34	4,06	2,96	6,63	3,44	6,64	3,62	4,12	3,73	2,41	2,91	2,42	2,75	3,17	2,17
	Monozyten	0,31	0,09	0,06	0,07	0,37	0,32	0,14	0,35	0,15	0,31	0,20	0,28	0,23	0,42	0,50	0,41	0,31	0,19	0,29	0,36
	Eosinophile Granulozyten	0,22	0,15	0,20	0,18	0,14	0,14	0,12	0,14	0,25	0,15	0,12	0,14	0,35	0,14	0,08	0,28	0,06	0,12	0,05	0,09
	Basophile Granulozyten	0,04	0,02	0,03	0,04	0,01	0,02	0,01	0,01	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,03	0,01	0,01
Pferd Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
N 4	Lymphozyten	1,74	2,27	5,50	2,23	2,12	2,64	2,94	2,03	4,21	3,18	3,05	3,20	3,47	2,51	1,84	1,67	1,82	2,18	2,10	2,86
	Monozyten	0,44	0,11	0,40	0,32	0,32	0,47	0,48	0,37	0,30	0,39	0,34	0,53	0,28	0,53	0,40	0,43	0,47	0,32	0,51	0,49
	Eosinophile Granulozyten	0,13	0,10	0,22	0,15	0,14	0,09	0,11	0,09	0,18	0,13	0,14	0,10	0,29	0,12	0,08	0,08	0,05	0,07	0,05	0,02
	Basophile Granulozyten	0,01	0,01	0,04	0,01	0,01	0,09	0,01	0,01	0,03	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Pferd Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
N 24	Lymphozyten	1,86	3,36	4,74	3,07	2,96	3,06	3,43	1,85	3,56	3,20	3,49	3,43	3,31	3,06	2,62	2,88	2,41	3,32	2,73	2,03
	Monozyten	0,23	0,27	0,29	0,36	0,24	0,44	0,28	0,28	0,29	0,35	0,27	0,27	0,29	0,34	0,22	0,57	0,21	0,49	0,18	0,86
	Eosinophile Granulozyten	0,14	0,10	0,23	0,09	0,18	0,15	0,05	0,12	0,12	0,14	0,14	0,23	0,18	0,12	0,11	0,21	0,05	0,20	0,05	0,00
	Basophile Granulozyten	0,01	0,01	0,06	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,04	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,00
Pferd Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
N 48	Lymphozyten	2,29	2,92	3,30	3,95	2,89	2,96	3,84	2,66	2,70	3,00	2,99	2,97	3,20	3,22	2,32	2,71	2,59	2,69	2,80	3,12
	Monozyten	0,27	0,04	0,47	0,29	0,21	0,47	0,51	0,11	0,20	0,73	0,11	0,43	0,23	0,42	0,23	0,73	0,54	0,20	0,15	0,22
	Eosinophile Granulozyten	0,14	0,13	0,13	0,13	0,21	0,14	0,12	0,12	0,21	0,21	0,21	0,12	0,10	0,13	0,10	0,21	0,08	0,16	0,04	0,11
	Basophile Granulozyten	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,00	0,02

**Tabelle 12: Werte der Lymphozyten, Monozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten im Serum über einen Zeitraum von 48 Stunden (n=20) in [G/l].**

**Tabelle 13: Verhältnis neutrophiler Granulozyten zu Lymphozyten  
über einen Zeitraum von 48 Stunden (n=20).**

Pferd Nr.	V	N 0	N 4	N 24	N 48
1	1,85	2,42	4,15	2,18	1,80
2	0,97	0,73	2,20	1,25	1,11
3	0,89	0,53	1,24	0,73	1,16
4	1,11	0,78	2,54	1,29	0,96
5	1,34	1,15	2,60	1,58	1,32
6	1,05	0,75	2,44	1,38	1,15
7	0,99	0,91	2,51	1,39	1,05
8	1,15	1,32	2,07	1,03	1,07
9	0,86	0,66	1,28	0,98	1,26
10	0,95	1,45	1,88	1,36	1,27
11	0,97	0,50	1,62	1,15	1,56
12	0,89	1,04	1,95	1,21	1,36
13	1,21	0,86	1,27	0,95	1,41
14	1,52	1,50	2,98	1,57	1,44
15	1,69	1,44	3,42	1,40	1,65
16	1,79	1,62	2,18	1,77	1,93
17	1,95	2,69	2,94	1,56	1,40
18	1,12	1,17	2,94	1,44	1,42
19	1,00	0,98	2,82	1,18	0,75
20	1,22	1,15	1,63	3,93	1,26

**Tabelle 14: Verhältnis stabkerniger zu segmentkernigen Granulozyten im Serum über einen Zeitraum von 48 Stunden (n=20).**

Pferd Nr.	V	N 0	N 4	N 24	N 48
1	0,22	0,09	0,22	0,25	0,40
2	0,35	0,16	0,14	0,17	0,39
3	0,25	0,10	0,38	0,52	0,29
4	0,17	0,13	0,25	0,22	0,31
5	0,09	0,11	0,19	0,13	0,16
6	0,24	0,17	0,31	0,26	0,61
7	0,10	0,21	0,20	0,23	0,20
8	0,00	0,36	0,50	0,27	0,44
9	0,13	0,21	0,26	0,21	0,26
10	0,20	0,15	0,26	0,33	0,50
11	0,10	0,20	0,30	0,40	0,30
12	0,20	0,11	0,19	0,30	0,25
13	0,38	0,20	0,41	0,44	0,29
14	0,12	0,11	0,16	0,25	0,33
15	0,10	0,13	0,12	0,29	0,32
16	0,16	0,24	0,14	0,07	0,32
17	0,15	0,13	0,36	0,23	0,74
18	0,16	0,14	0,09	0,34	0,34
19	0,19	0,11	0,29	0,38	0,32
20	0,14	0,09	0,14	0,27	0,15

**Tabelle 15: Werte von Gesamteiweiß und Hämatokrit über einen Zeitraum von 48 Stunden nach Trainingsbelastung beim Traber (n=20) in [%].**

Pferd Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
V	Gesamteiweiß [mg/ml]	50	53	47	54	46	53	42	47	50	56	77	52	50	46	45	50	57	43	46	55
	Hämatokrit [%]	37	38	35	45	38	34	37	36	34	31	32	35	34	38	33	38	33	38	39	46
<b>Pferd Nr.</b>																					
N 0	Gesamteiweiß [mg/ml]	53	46	53	69	52	44	58	48	55	48	46	48	53	54	49	60	59	51	51	55
	Hämatokrit [%]	43	45	38	49	47	47	46	45	38	35	39	39	41	45	47	40	46	49	48	49
<b>Pferd Nr.</b>																					
N 4	Gesamteiweiß [mg/ml]	50	54	58	55	51	55	56	49	53	52	56	47	52	51	53	60	64	44	43	43
	Hämatokrit [%]	41	35	34	40	37	35	42	34	37	33	33	35	37	36	30	30	38	42	42	36
<b>Pferd Nr.</b>																					
N 24	Gesamteiweiß [mg/ml]	48	42	59	51	46	41	43	48	60	46	56	46	46	45	47	58	51	48	43	48
	Hämatokrit [%]	34	33	34	35	38	35	36	35	35	34	34	31	34	36	32	35	35	45	34	43
<b>Pferd Nr.</b>																					
N 48	Gesamteiweiß [mg/ml]	52	55	52	41	47	48	49	48	45	48	54	48	49	46	51	45	79	41	45	49
	Hämatokrit [%]	35	35	33	38	38	35	36	33	34	38	33	34	35	37	36	37	35	40	35	41

	Pferd Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
V	Erythrozyten [T/l]	7,68	8,59	10,03	13,66	8,64	7,43	8,82	7,58	9,81	9,64	8,24	9,27	7,93	8,22	6,78	8,38	11,79	8,81	8,74	11,11
	Hämoglobin [g/dl]	12,40	12,7	10,8	13,8	12,1	12,4	12,5	13	11,2	13	14,1	11,6	14,70	20,00	24,30	14,40	19,00	20,70	13,70	14,55
	Pferd Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
N 0	Erythrozyten [T/l]	13,34	11,40	10,20	13,36	11,00	10,15	11,25	9,58	10,48	9,94	10,36	9,30	10,23	10,61	9,85	12,26	11,16	13,98	11,59	11,37
	Hämoglobin [g/dl]	25,50	15,8	13,2	14,5	16,4	15,1	16,2	18,1	17,9	18,9	21,2	16,1	17,80	17,70	23,40	26,50	19,70	23,30	24,10	19,02
	Pferd Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
N 4	Erythrozyten [T/l]	8,94	10,68	9,89	12,20	8,38	8,26	9,28	8,10	8,49	9,70	8,73	8,38	9,79	8,40	7,88	9,13	8,40	8,42	10,47	8,01
	Hämoglobin [g/dl]	11,60	13,3	14,1	15,3	15,6	14,8	13	14,5	12,9	13	13,8	13,4	16,80	13,30	23,20	15,30	18,40	13,40	15,40	14,79
	Pferd Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
N 24	Erythrozyten [T/l]	6,46	8,30	9,87	8,26	8,82	9,44	10,24	7,76	8,33	9,62	9,15	7,38	8,12	8,53	6,78	8,91	8,42	10,13	7,76	9,26
	Hämoglobin [g/dl]	12,80	13,9	14,3	12,9	12,3	11,3	13,6	16,7	11,6	15,6	15,3	15,9	12,50	13,60	13,80	16,30	12,50	15,80	11,50	13,80
	Pferd Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
N 48	Erythrozyten [T/l]	7,59	7,94	8,84	8,02	8,71	8,18	9,72	7,21	8,19	9,59	8,30	8,05	8,15	8,94	7,97	10,85	8,19	8,25	7,29	9,38
	Hämoglobin [g/dl]	12,40	13	12,9	11,9	12,2	12,2	13,9	14,6	13,6	13,2	19,2	13,3	12,30	12,50	14,30	15,80	12,30	15,80	13,40	13,62

**Tabelle 16: Werte von Erythrozyten und Hämoglobin über einen Zeitraum von 48 Stunden nach Trainingsbelastung beim Traber (n=20).**

**Tabelle 17: Werte der Malondialdehyd-Konzentration  
im Serum über einen Zeitraum von 48 Stunden nach Trainingsbelastung beim Traber  
(n=20) in [RFU].**

Pferd Nr.	V	N 0	N 4	N 24	N 48
1	45822,50	57958,00	46239,50	32453,50	32481,00
2	44610,50	43564,50	38443,50	41062,00	37459,50
3	52621,50	63531,50	58901,00	59201,00	64242,00
4	48530,00	54831,00	53144,00	47674,50	45084,00
5	44970,50	51151,50	47325,00	48635,00	50065,50
6	44839,50	57428,00	55486,50	61521,00	58990,50
7	46911,50	58466,00	45462,50	52524,50	51525,00
8	39547,50	39206,50	42453,00	46333,50	31484,50
9	46163,50	49253,50	45522,50	51593,00	51976,00
10	48200,00	51021,00	47398,00	38982,50	43187,00
11	38749,50	56112,50	52607,50	48029,00	43892,50
12	40337,50	45289,50	50934,00	52873,50	46063,50
13	48698,50	54095,00	49893,50	50487,00	50279,50
14	43078,00	44040,00	44802,50	46757,00	41951,50
15	36101,00	44354,00	44834,50	40731,00	38029,50
16	52656,50	59204,00	55121,50	63330,50	60041,00
17	51604,00	58749,50	49805,00	49662,00	44422,50
18	46911,50	58496,00	54462,50	52524,50	51525,00
19	36101,00	44354,00	44834,50	49731,00	45060,50
20	51151,50	52217,00	48635,50	53565,50	52420,00

**Tabelle 18: Werte der proteingebundenen Carbonyle im Plasma über einen Zeitraum von 48 Stunden nach Trainingsbelastung beim Traber (n=20) in [pmol/mg].**

Pferd Nr.	V	N 0	N 4	N 24	N 48
1	475,46	498,89	459,60	519,14	490,55
2	423,37	516,04	464,62	486,70	497,95
3	299,59	351,65	322,00	293,87	305,84
4	456,44	426,20	456,67	439,28	422,28
5	431,92	420,72	393,23	422,92	415,63
6	479,42	497,14	473,18	410,04	506,48
7	369,20	415,59	379,69	399,20	404,93
8	345,12	364,58	404,87	407,45	393,49
9	343,92	352,13	337,48	290,85	296,03
10	326,35	284,09	370,24	315,50	344,59
11	311,94	420,93	347,88	351,73	385,21
12	377,00	340,20	337,34	318,04	306,61
13	335,61	341,53	336,63	400,99	327,28
14	350,49	381,56	270,54	331,34	343,33
15	550,59	428,05	427,32	476,76	469,06
16	400,76	386,07	387,21	389,81	464,43
17	410,25	378,04	338,04	374,33	399,99
18	417,90	499,54	447,23	389,69	307,20
19	422,43	518,27	602,24	560,55	454,25
20	523,90	581,47	492,79	464,49	461,62

**Tabelle 19: Referenzbereiche der Kreatin-Kinase beim Pferd**

Literaturquelle	Referenzbereich CK (U/l)
Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (1982)	< 90
(Valberg, et al., 1994)	10-350
(Schäfer, 1999)	< 220
(Sloet & Goering, 2000)	75-160

**Tabelle 20: Referenzbereiche der Aspartat-Amino-Transferase beim Pferd**

Literaturquelle	Referenzbereich AST (U/l)
Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (1982)	< 90
(Valberg, Jönsson, Lindholm, & Holmgren, 1993)	< 552
(Schäfer, 1999)	< 220

## 10 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Teile der in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht:

- Haberkamp K., Bondzio A., Arndt G., Einspanier R., Carstanjen B.  
*Exercise-induced alterations in serum myeloperoxidase in Standardbreds.*  
Journal of Veterinary Science, 2013 (Epub ahead of print)
- Als "Short Communication" beim 17. SIVE International Congress 2011, Montesilvano.  
*Haberkamp et al.* Proceedings of the 17<sup>th</sup> Sive International Congress 2011, Montesilvano, Italien: 253

## 11 DANKSAGUNG

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Carstanjen, für die Überlassung des Themas und die Unterstützung auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit bedanken!

Ein großer Dank geht auch an das Team der Biochemie! Ganz besonders an Frau Dr. Bondzio, die jederzeit ein offenes Ohr für alle großen und kleinen Probleme hatte und es schafft immer wieder Interesse an der Biochemie zu wecken!

Auch ohne Frau Ursula Scholz und Frau Petra Schulze hätte ich wohl zwischen Pipetten und Reagenzgläsern oft nicht weiter gewußt. Meinen herzlichen Dank!

Ein Dank auch an Frau Ellen Blank, die mit ihrem stillen Humor und ihrer Hilfsbereitschaft oft ein Fels in der Brandung des Klinikalltags war. Besonders wenn Messgeräte ein Eigenleben entwickelten....

Ein herzliches Dankeschön an Herrn Dr. Hilmert, der die „Pferdefrau“ in seinem Labor jederzeit freundlich und entgegenkommend unterstützt hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Arndt, die mir mit viel Geduld und Fachwissen zur Seite gestanden hat!

Ein paar Menschen waren ganz besonders unverzichtbar bei der Umsetzung dieser Arbeit. Ohne Euch, liebe Stefanie Knoblich und Dr. Susanne Schönert, würde es diese Arbeit so wohl nicht geben! Für die Motivation, sehr tatkräftige Unterstützung und, und, und, kann ich mich hier kaum genug bedanken! Die Abende mit Euch werde ich vermissen!

Ein Gruß geht an das Team der Pferdeklinik Berlin und meine Mitdoktoranden, besonders an Maria Čisláková, die die „Neue“ damals so freundlich aufgenommen hat. Ich wünsche Dir alles Gute!

Für die nette Mitarbeit möchte ich mich herzlich bei den Pferdebesitzern, sowie Trainern und Fahrern der untersuchten Pferde bedanken!

Während der Arbeit an dieser Dissertation hat meine Familie mich in allen Lebenslagen unterstützt und motiviert!

Ich danke Euch von ganzem Herzen!!

## **12 SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die vorgenannten Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Düsseldorf, den 03.03.2013

Katrin Haberkamp