

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

**Der Einfluss von Magnesiumaspartat-Hydrochlorid
auf die Insulinsensitivität bei Pferden mit
Equinem metabolischen Syndrom**

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

vorgelegt von
Eva Maria Therese Müller
Tierärztin aus Neuss

Berlin 2021
Journal-Nr.: 4302

Aus der Klinik für Pferde, Allgemeine Chirurgie und Radiologie

des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

**Der Einfluss von Magnesiumaspartat-Hydrochlorid auf die Insulinsensitivität bei
Pferden mit Equinem metabolischen Syndrom**

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

vorgelegt von
Eva Maria Therese Müller
Tierärztin
aus Neuss

Berlin 2021

Journal-Nr.: 4302

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Gehlen
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jörg Aschenbach
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

horses, insulin, susceptibility, metabolic syndrome, magnesium, type 2 diabetes

Tag der Promotion: 10.12.2021

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-96729-152-0

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2021

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

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 2022 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meinen Eltern gewidmet

-

In Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
2. Literatur	2
2.1. Physiologische Grundlagen von Glukose, Insulin, Magnesium, Fettgewebe	2
2.1.1. Glukosemetabolismus	2
2.1.2. Insulinmetabolismus	3
2.1.3. Magnesiummetabolismus	4
2.1.4. Fettgewebe	5
2.2. Pathophysiologie des metabolischen Syndroms bei Pferden und Menschen	5
2.2.1. Metabolisches Syndrom beim Pferd	5
2.2.1.1. Vorkommen	5
2.2.1.2. Risikofaktoren	6
2.2.1.2.1. Insulindysregulation/-resistenz	6
2.2.1.2.2. Fettleibigkeit	7
2.2.1.3. Erscheinungsbild	9
2.2.1.3.1. Fettverteilung und Bewertungssysteme	9
2.2.1.3.2. Hufrehe	13
2.2.1.4. Diagnostik	14
2.2.1.4.1. Dynamische Tests	15
2.2.1.5. Ansätze zur Behandlung und Prophylaxe des Equinen metabolischen Syndroms	19
2.2.2. Metabolisches Syndrom beim Menschen	21
2.3. Zusammenfassung der Unterschiede und Gemeinsamkeiten des metabolischen Syndroms beim Menschen und beim Pferd	23
2.3.1. Magnesiummetabolismus beim Menschen mit metabolischem Syndrom	23
2.3.2. Magnesiumstoffwechsel beim Pferd mit metabolischem Syndrom	25
2.4. Zusammenhang zur eigenen Fragestellung	26

3. Material und Methoden	28
3.1. In-vivo-Studie an EMS-Patienten	28
3.1.1. Studienpopulation	28
3.1.1.1. Studiendesign	28
3.1.1.2. Fallzahl	28
3.1.1.3. Einschlusskriterien	28
3.1.1.4. Ausschlusskriterien	28
3.1.2. Studienablauf	29
3.1.3. Zusammensetzung Verum- und Placebo-Präparat	31
3.1.4. Experimenteller Aufbau	32
3.1.4.1. Blutentnahme und Parameter	32
3.1.4.2. Ermittlung der Proxies RISQI und MIRG	34
3.1.4.3. Intrazelluläre Magnesiummessung	35
3.2. Auswertungen	38
4. Ergebnisse	40
4.1. Studienpopulation	40
4.2. Blutentnahme und Zellisolation	40
4.2.1. Parameter des cGITs und der Insulinsensitivität	40
4.2.1.1. Glukose	40
4.2.1.2. Ergebnisse cGIT	41
4.2.1.3. Insulin	42
4.2.1.3.1. Nüchterninsulin	42
4.2.1.3.2. Stimuliertes Insulin nach 45 Minuten	43
4.2.1.4. RISQI	45
4.2.1.5. MIRG	46
4.2.2. Weitere erhobene Blutparameter	46
4.2.2.1. Magnesium im Serum	46
4.2.2.2. Triglyzeride und GGT	47
4.2.2.3. Fruktosamin	48
4.2.3. Zellisolation	49
4.2.3.1. Zellzahl	49
4.2.3.2. Intrazelluläres Magnesium	49
4.2.3.2.1. Intrazelluläres Magnesium zum Zeitpunkt 0	49
4.2.3.2.2. Intrazelluläres Magnesium zum Zeitpunkt 45	50
4.2.3.2.3. Einflussfaktoren auf das intrazelluläre Magnesium	51

4.2.3.2.3.1. Magnesium intrazellulär nach Placebo-/Verum-Gabe _____	51
4.2.3.2.3.2. Magnesium intrazellulär Differenz _____	54
4.2.3.2.3.3. Magnesium intrazellulär vor Placebo-/Verum-Verabreichung _____	54
4.3. Nebenwirkungen _____	56
4.4. Fazit _____	57
5. Diskussion _____	58
5.1. Auswahl der Studienpopulation _____	58
5.2. Durchführung des cGIT _____	59
5.3. Intrazelluläre Magnesiummessung _____	61
5.4. Intrazellulärer Magnesiumgehalt und Magnesiumgehalt im Serum _____	62
5.5. Hyperinsulinämie _____	64
5.6. Darreichungsform des Magnesiumaspartat-Hydrochlorids _____	65
5.7. Compliance der Besitzer und Haltungsbedingungen _____	66
6. Zusammenfassung _____	67
7. Summary _____	69
8. Literaturverzeichnis _____	71
Anhang _____	90
Publikationen _____	106
Danksagung _____	107
Interessenskonflikte – Conflict of Interest _____	108
Selbstständigkeitserklärung _____	108

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fettansatzstellen nach Henneke et al. (1983) und Frank et al. (2010). Illustration von Gernhardt (2021).	10
Abbildung 2: Cresty Neck Score (CNS 1-5) nach Carter et al. (2009), Illustration von Gernhardt (2021).	13
Abbildung 3: Zweiphasiger Verlauf des cGITs und Wiederholbarkeit (Eiler et al. 2005).	17
Abbildung 4: Studienablauf (Tag – 1 bis 3 Monate).	31
Abbildung 5: Zentrifugierte Probe vor der Lymphozytenextraktion.	35
Abbildung 6: Lymphozyten.	36
Abbildung 7: Gleichung zur Berechnung der Ionenkonzentration mittels Spektrofluorometer (Gryniewicz et al. 1985).	38
Abbildung 8: Vergleich des cGITs vorher/nachher zwischen den Gruppen A & B.	42
Abbildung 9: Vergleich stimuliertes Insulin vorher/nachher zwischen den Gruppen A & B.	44
Abbildung 10: Lineare Regression (Einfluss cGIT auf intrazellulären Magnesiumgehalt nach Placebo-Gabe).	52
Abbildung 11: Lineare Regression (Einfluss RISQI auf das intrazelluläre Magnesium nach Placebo-Gabe).	53
Abbildung 12: Lineare Regression (Einfluss von Fruktosamin auf den intrazellulären Magnesiumgehalt nach Placebo-Gabe).	54
Abbildung 13: Lineare Regression (Einfluss von Nüchterninsulin auf den intrazellulären Magnesiumgehalt vor der Placebo-/Verum-Gabe).	55
Abbildung 14: Lineare Regression (Einfluss von RISQI auf den intrazellulären Magnesiumgehalt vor der Placebo-/Verum-Gabe).	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Interpretation der basalen Glukose- und Insulin-Werte bei Pferden nach einer 6-stündigen Hungerperiode (Reed 2018).....	7
Tabelle 2: Body Condition Score (BCS 1-9) nach Henneke et al. (1983).....	10
Tabelle 3: Dynamische Tests im Überblick in Anlehnung an das Handout der Roadshow 2019 von Boehringer Ingelheim "Insulin Dysregulation Diagnostik und Management bei EMS und PPID".	15
Tabelle 4: Folgen oder Ursachen für HMS (Humanes metabolisches Syndrom) und EMS. ...	23
Tabelle 5: Obel Score zur Beurteilung einer Lahmheit; Grad 0 – 4 (Meier et al. 2019).	29
Tabelle 6: Nüchternglukose (mg/dl).....	41
Tabelle 7: Ergebnisse cGIT (ZP in Minuten).....	41
Tabelle 8: Nüchterninsulin (μ U/ml).	43
Tabelle 9: Stimuliertes Insulin nach 45 Minuten (μ U/ml).	43
Tabelle 10: RISQI.....	45
Tabelle 11: MIRG.	46
Tabelle 12: Nüchternmagnesium (mmol/l).	47
Tabelle 13: Basale GGT (U/l).	47
Tabelle 14: Basale Hypertriglyzeridämie (mg/dl).....	48
Tabelle 15: Basale Fruktosamin-Werte (μ mol/l).....	48
Tabelle 16: Basales intrazelluläres Magnesium zum Zeitpunkt 0 (mmol/l).	50
Tabelle 17: Stimuliertes intrazelluläres Magnesium zum Zeitpunkt 45 (mmol/l).	50
Tabelle 18: Übersicht Signifikanz und Regressionskoeffizient.	52

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	-	Adrenocorticotropes-Hormon
ATP	-	Adenosintriphosphat
BCS	-	Body Condition Score
BIC	-	Basal serum insulin concentration
bzw.	-	Beziehungsweise
°C	-	Grad Celsius
Ca	-	Calcium
ca.	-	Circa
cGIT	-	Kombinierter Glukose-Insulin-Toleranztest
cm	-	Zentimeter
CNS	-	Cresty Neck Score
d.h.	-	Das heißt
dl	-	Deziliter
ECS	-	Equine cushing Syndrom
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	-	Ethylendioxytetraessigsäure
EMS	-	Equines metabolisches Syndrom
et al.	-	Und andere
FSIGTT	-	Frequently sampled insulin-modified intravenous glucose tolerance test
g	-	Gramm
<i>g</i>	-	Erdbeschleunigung
GGT	-	Gamma-Glutamyl-Transferase
GIP	-	Glukoseabhängiges insulinotropes Peptid
GLP	-	Glucagon-like Peptid
GLUT	-	Erleichterte Glukosetransporter
HBSS	-	Hanks'Salz-Lösung
HEC	-	Hyperinsulinemic-euglycemic clamp
ID	-	Insulindysregulation
IE	-	Internationale Einheit
IL- 1	-	Interleukin- 1
IL- 6	-	Interleukin- 6
IQR	-	Interquartilbereich (Interquartil range)
IR	-	Insulinresistenz

IRT	-	Insulin response test
i.v.	-	Intravenös
i.z.	-	Intrazellulär
kg	-	Kilogramm
KGW	-	Körpergewicht
l	-	Liter
µl	-	Mikroliter
Mg	-	Magnesium
mg	-	Milligramm
MgCl ₂	-	Magnesiumchlorid
MIRG	-	Modified insulin-to-glucose ratio
ml	-	Milliliter
mmol	-	Millimol
n	-	Anzahl
NaCl	-	Natriumchlorid
nm	-	Nanometer
OGT	-	Oral glucose test
OST	-	Oral sugar test
p	-	Probabilitas = Wahrscheinlichkeit
pg	-	Picogramm
PPAR _γ	-	Peroxisome proliferator activator receptor γ
PPID	-	Pars pituitary intermedia dysfunction
RISQI	-	Reciprocal inverse square of insulin
Rpm	-	Revolution per minute (engl.); Umdrehung pro Minute
SD	-	Standardabweichung
SGLT-2	-	Natrium-Glukose Co-Transporter 2
TG	-	Triglyzeride
TNF- α	-	Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha
U	-	Unit
µU	-	Mikrounits
u.a.	-	Unter anderem
V.	-	Vena
v.a.	-	Vor allem
ZP	-	Zeitpunkt

1. Einleitung

Der Begriff „Equines metabolisches Syndrom“ (EMS) wurde in der Veterinärmedizin erstmalig im Jahre 2002 geprägt, als Johnson Fettleibigkeit, Insulinresistenz (IR) und Hufrehe zu Komponenten des klinischen Syndroms zusammenfasste. EMS ist eine der meistverbreiteten endokrinen Störung in der Pferdepraxis. Es vereint verschiedene Risikofaktoren, die eine endokrinopathische Hufrehe auslösen können. Die Insulindysregulation (ID) stellt u.a. einen der wichtigsten Risikofaktoren dar. Da eine endokrinopathische Hufrehe-Erkrankung fatale Auswirkungen haben kann und in dramatischen Fällen mit einer Euthanasie einhergeht, wird die Forschung im Hinblick auf das Management und die Behandlungsmöglichkeiten dieses Syndroms immer bedeutender.

Das Equine metabolische Syndrom zeigt viele Parallelen zum metabolischen Syndrom des Menschen, genauer dem Diabetes Mellitus Typ II. Verschiedene Studien in der Humanmedizin zeigen, dass eine hohe Magnesium-Zufuhr einen positiven Effekt auf die Risikominderung einer Erkrankung an Diabetes Mellitus hat und die Supplementierung von Magnesium die Insulinsensitivität verbessert.

In der Veterinärmedizin gibt es bisher nur wenige Untersuchungen zu den Auswirkungen von Magnesium auf die Insulinsensitivität und ihre Ergebnisse sind sehr unterschiedlich.

Im Rahmen dieser Studie sollen folgende Aspekte untersucht werden:

1. Führt die Supplementierung mit 30 mg/kg KGW Magnesium als Magnesiumaspartat-Hydrochlorid über einen Zeitraum von drei Monaten zu einer Besserung der Insulinsensitivität?
2. Führt eine Supplementierung mit 30 mg/kg KGW Magnesium als Magnesiumaspartat-Hydrochlorid zu einem Anstieg der Serum- oder intrazellulären Magnesium-Konzentration?
3. Treten dabei Nebenwirkungen auf?

2. Literatur

2.1. Physiologische Grundlagen von Glukose, Insulin, Magnesium, Fettgewebe

2.1.1. Glukosemetabolismus

Glukose gehört zur Gruppe der Monosaccharide und ist ein wichtiger Bestandteil des Kohlenhydratstoffwechsels. Sie wird über die Nahrung aufgenommen, dient als Energielieferant und wird in Form von Glykogen als Energiereserve gespeichert (Faller 2004).

Nach oraler Glukoseaufnahme über die Nahrung wird D-Glukose im Dünndarm absorbiert. Dies geschieht sowohl insulinunabhängig über Glukose-Transporter als auch insulinabhängig mit Hilfe von Proteinen, die erleichterte Glukosetransporter (GLUT) genannt werden (Dyer et al. 2009, Shirazi-Beechey et al. 2011, Lacombe 2014).

Zur enteralen Absorption muss beim insulinunabhängigen Weg Natrium vorhanden sein, um mittels Natrium-Glukose-Co-Transporter absorbiert werden zu können (Dyer et al. 2009, Shirazi-Beechey et al. 2011). Im weiteren Verlauf wird Incretin, ein gastrointestinales Hormon, von den endokrinen Zellen des Gastrointestinaltraktes sezerniert (Marks et al. 1991). Zu den Incretin Hormonen zählen das Glucagon-like Peptid-1 (GLP-1) sowie das glukoseabhängige insulinotrope Peptid (GIP) (Morgan 1998). Diese führen dazu, dass Insulin bei einer Hyperglykämie/ nach einer Futteraufnahme sezerniert wird (de Laat et al. 2016, Fitzgerald et al. 2019) und erklärt, warum die Insulinkonzentration nach einer hohen Glukose-Aufnahme über die Nahrung höher ist als bei einer intravenösen Applikation (Marks et al. 1991, Duhlmeier et al. 2001).

Nach der enteralen Glukose-Absorption gelangt diese in den Leber-Kreislauf oder wird als Energiequelle in Muskelzellen benötigt (Silbernagel 2007). Die Aufnahme der Glukosemenge durch die Leber wird durch den Insulin- und Glukagongehalt im Blutkreislauf reguliert. Die Aufnahmemenge steigt mit der Insulinkonzentration im Blut und sinkt mit der des Glukagons (DiCostanzo et al. 2006). Für die Aufnahme sind die insulinabhängigen GLUT-2 und die Glukokinase verantwortlich (Mueckler 1994, Karim et al. 2012). Liegt eine geringe Glukosekonzentration im Blut vor, wird mit Hilfe der Glukoneogenese Glukose aus der Leber ausgeschleust (Karim et al. 2012).

Die Glukose wird in alle insulinsensitiven Gewebe aufgenommen und durch spezifische Proteine reguliert. Diese werden erleichterte Glukosetransporter genannt. GLUT-4 ist die größte Isoform im insulinreaktionsfähigen Gewebe, welches die insulingesteuerte Glukoseaufnahme determiniert (Lacombe 2014). Die Aufnahme von Glukose in die

Skelettmuskulatur und in das Fettgewebe wird durch eine erhöhte Insulinkonzentration über den Insulinrezeptor im Blut induziert. Dies bewirkt eine vermehrte Translokation von intrazellulärem GLUT-4 an der Zelloberfläche (Duehlmeier et al. 2010).

Der physiologische Glukosegehalt im Plasma liegt beim Pferd zwischen 3,3 und 5,0 mmol/l und wird meist in diesen Grenzen gehalten (Ralston 2002).

2.1.2. Insulinmetabolismus

Insulin ist ein Peptidhormon, das in den beta(β)-Zellen der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) gebildet wird und eine bedeutende Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel und in der Blutglukoseregulation spielt. Der Gegenspieler des Insulins ist das Glukagon. Auch dieses wird in der Bauchspeicheldrüse, allerdings in den alpha(α)-Zellen gebildet. Steigt nun durch die Nahrungsaufnahme der Glukosegehalt im Blut an, so wird über die β -Zellen des Pankreas Insulin ausgeschüttet. Dieses bewirkt durch Bindung an Rezeptoren der Muskel- und Fettzellen bzw. der Leberzellen einen Verbrauch der Glukose oder eine Glykogenbildung zur Anlage von Energiereserven (Silbernagel 2007).

Innerhalb der Zelle wird die Glukose durch die Glukokinase zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert (Rorsman und Braun 2013). Das Adenosintriphosphat (ATP) wird nach der Aufnahme von Glukose in die Zelle mit Hilfe der Glykolyse, des Citratzyklus und der Atmungskette gebildet. Magnesium dient als second messenger bei der Insulinsekretion durch das Pankreas. Hier bildet es Mg-ATP Komplexe und die Kalium-Kanäle werden geschlossen (Gunther 2010). Dadurch kommt es zu einer Depolarisation der Plasmamembran und zur Öffnung der spannungsabhängigen Calcium-Kanäle. Durch das Einströmen des Calciums in die Zelle kommt es zur Exozytose von insulinhaltigen Vesikeln (Rorsman und Braun 2013). Die Insulinreaktion ist biphasisch. Hier kommt es zu einem schnellen ersten Insulinpeak und einem langsameren zweiten Insulinpeak (Henquin et al. 2002). Nach der intravenösen Glukose-Applikation ist der erste Peak nach ungefähr 40 Minuten zu erwarten (Duhlmeier et al. 2001).

Des Weiteren besteht ein physiologischer Zusammenhang zwischen Insulin und Magnesium, denn Insulin förderte in verschiedenen Experimenten die Aufnahme von Magnesium in die Zelle. Eine signifikante intrazelluläre Erhöhung lag unter anderem in Lymphozyten vor (Delva et al. 1998). Man geht davon aus, dass die Insulin-Rezeptor-Tyrosinkinase eine entscheidende Rolle spielt. In einem Versuch wurden Antikörper eingesetzt, die gegen den Insulin-Rezeptor agierten und dessen Funktion komplett unterdrückten. Somit wurde auch die Magnesiumaufnahme nach intrazellulär beeinträchtigt. Dies spricht dafür, dass die

Magnesiumaufnahme nach intrazellulär ein Insulin-Rezeptor-vermittelter Prozess ist (Hwang et al. 1993, Kurth 2012). Außerdem hat Insulin vasoregulatorische Eigenschaften. So kann es das Gefäßendothel anregen Stickstoffmonoxid zu produzieren, das eine Vasodilatation zur Folge hat. Außerdem kann es die Sekretion von Endothelin-1, einem Vasokonstriktor, regulieren (Muniyappa et al. 2007).

2.1.3. Magnesiummetabolismus

Magnesium ist das viert wichtigste Kation im Körper (Chaudhary et al. 2010) und erhält mehr und mehr zunehmende Aufmerksamkeit, vor allem in der klinischen Medizin, Ernährung und Physiologie (Saris et al. 2000). Magnesium spielt eine große Rolle und ist als essentielles Mineral in eine breite Vielfalt verschiedener Prozesse involviert (Vormann 2003). Dieses Ion ist in gesunden Organismen nahezu konstant im Plasma vorhanden (Barbagallo et al. 2003) und beeinflusst viele zelluläre Funktionen, darin inbegriffen der Transport von Kalium und Calcium, sowie die Signaltransduktion, den Energiemetabolismus und die Zellproliferation (Saris et al. 2000). Bei einer ausgewogenen Ernährung wird der Bedarf an Magnesium in den meisten Fällen über die Nahrung gedeckt. Die Konzentration wird hauptsächlich durch die Niere (Vormann 2003), das Insulin als Hormon (Alzaid et al. 1995) und gastrointestinale Verluste (Chaudhary et al. 2010) beeinflusst.

Insulin hat nicht nur Einfluss auf die Magnesiumhomöostase, sondern auch umgekehrt. Magnesium hat auch einen Einfluss auf die Insulinsekretion, -bindung und -aktivität (Chaudhary et al. 2010). Auch der Einfluss auf die Membranstabilität ist von Bedeutung, da Magnesium die negativ geladenen, carboxylierten und phosphorylierten Lipide vernetzt und somit auch auf die Verteilung anderer Mineralstoffe einwirkt (Cowan 1995). Dieses Mineral hat sowohl Wirkung auf die Tyrosinkinase-Aktivität auf Insulinrezeptorebene als auch auf die intrazelluläre Calciumkonzentration. Somit kann ein Missverhältnis zu einer Verschlechterung der Insulinresistenz und Hypertonie führen (Barbagallo et al. 2003, Chaudhary et al. 2010). Der intrazelluläre Magnesiumgehalt spiegelt den Magnesiumgehalt im Gewebe wider (Vormann 2003). Somit ist dieser deutlich repräsentativer für die Magnesiumkonzentration im Gewebe (Walser 1967), denn der Serum-Magnesiumgehalt kann zunächst durch das Leeren von intrazellulären- oder Knochen-Speichern in den physiologischen Grenzen gehalten werden (Vormann 2003). Der Magnesiumhaushalt wird zusätzlich durch Katecholamine beeinflusst. Diese bewirken einen Magnesiumtransport von intra- nach extrazellulär (Romani and Maguire 2002).

2.1.4. Fettgewebe

Das Fettgewebe des Menschen und des Tieres ist vom Aufbau und der Funktion nahezu identisch, sodass einige Erkenntnisse aus der Humanmedizin für die Tiermedizin übernommen werden können (Ertelt et al. 2014). Das Fettgewebe besteht hauptsächlich aus Adipozyten. Man unterscheidet braunes und weißes Fettgewebe (Liebich 2003). Es dient als Fett-/Energiespeicher und zusätzlich als endokrines Organ (Radin et al. 2009). Die Adipozyten reagieren auf hormonelle und nährstoffbedingte Einflüsse mit Speicherung überschüssiger Nährstoffe als Lipide im Gewebe oder Mobilisierung von eingelagertem Fett zur Verwertung (Manteiga et al. 2013). Bei einer physiologischen Gewichtszunahme ändert sich die Zellzahl nicht, allerdings kommt es zu einem Zellwachstum, denn es werden vermehrt Lipide in die Zelle eingelagert (Manteiga et al. 2013).

2.2. Pathophysiologie des metabolischen Syndroms bei Pferden und Menschen

Kommen der Glukose-, Insulin-, Magnesiummetabolismus oder das Fettgewebe aus dem physiologischen Gleichgewicht, kann dies verschiedene Folgen haben.

2.2.1. Metabolisches Syndrom beim Pferd

Die Begrifflichkeit „Equines metabolisches Syndrom“ wurde erstmals 2002 eingeführt und von Johnson geprägt (Johnson 2002). Beim Equinen metabolischen Syndrom werden die Komponenten Fettleibigkeit, Insulinresistenz und Hufrehe in einen Zusammenhang gebracht (Frank et al. 2010). Das Equine metabolische Syndrom ist laut Definitionen keine Krankheit als solches, sondern eine Zusammenfassung diverser Risikofaktoren für die Entstehung einer endokrinopathischen Hufrehe (Durham et al. 2019). Als Hauptrisiko wird die Insulindysregulation genannt (Burns 2016).

2.2.1.1. Vorkommen

Hauptsächlich wird das Equine metabolische Syndrom bei domestizierten Pferderassen diagnostiziert (Johnson et al. 2012). Die Tendenz ist steigend (Burns 2016). In einer Studie in Schottland wurden 45% der Pferde (Wyse et al. 2008), in einer Studie in Großbritannien 17,7% der Pferde als fettleibig eingestuft (Stephenson et al. 2011). Das Überangebot an Kohlenhydraten (Johnson et al. 2012), der hohe Konsum von Futter, das Grasen auf satten

Wiesen (Geor 2008) und eine geringe physische Aktivität stellen prädisponierende Faktoren dar (Johnson et al. 2012). Bereits die Fütterung der Mutterstute, sowie die im Fohlenalter, können ein Risiko für die Entwicklung des Equinen metabolischen Syndroms darstellen (Becvarova und Buechner-Maxwell 2012). Frank spricht davon, dass vor allem "leichtfuttrige" Pferderassen das Equine metabolische Syndrom entwickeln. Häufig betroffen sind verschiedene „Ponyrassen, Paso Finos, Morgan Horses, Saddlebreds, Quarter Horses sowie Tennessee Walking Horses“ (Frank 2011).

Es gibt verschiedene epidemiologische Studien: In einer Studie von Morgan et al. wurden Ponies in Australien untersucht. Hier zeigten 27% der Studienpopulation eine Hyperinsulinämie (Morgan et al. 2014). In einer Studie von Muno et al. zeigten 22,3% der Pferde in Ohio eine Hyperinsulinämie (Muno 2009). Studien zeigen auch, dass ältere Pferde und Ponies ein erhöhtes Risiko für eine Hyperinsulinämie (Muno 2009, Morgan et al. 2014) und ältere Pferde für eine geringere Insulinsensitivität haben (Rapson et al. 2018). Es scheint als gäbe es Rasseunterschiede in der Insulinsensitivität. So zeigten Bamford et al., dass Andalusier und Ponies eine geringere Insulinsensitivität haben als Standardbreds (Bamford et al. 2014). Auch das Training hat einen positiven Einfluss auf die Insulinsensitivität sowohl bei älteren als auch jüngeren Stuten (Liburt et al. 2011). Geschlechtsprädispositionen scheint es nicht zu geben (Muno 2009).

2.2.1.2. Risikofaktoren

2.2.1.2.1. Insulindysregulation/-resistenz

Die Insulindysregulation bzw. Insulinresistenz ist eine der Hauptkomponenten des Equinen metabolischen Syndroms und somit ein bedeutender Risikofaktor für die Entstehung einer endokrinopathischen Hufrehe (Durham et al. 2019).

Es gibt verschiedene Stadien, die in diesem Zusammenhang erwähnt werden:

1. Insulindysregulation/-resistenz
2. Kompensierte Insulinresistenz
3. Dekompensierte Insulinresistenz

Bei einer Insulindysregulation kommt es zu einem verminderten Ansprechen des Gewebes auf Insulin oder einer veränderten Insulin-Clearance (Reed 2018). Liegt eine Hyperinsulinämie vor, muss sich nicht zwingend eine Hyperglykämie einstellen (Asplin et al. 2007). Liegt eine Hyperinsulinämie bei normaler Glukosekonzentration vor, so spricht man von einer kompensierten Insulinresistenz (Treiber et al. 2005). Die dekompenzierte Form der

Insulinresistenz resultiert meist aus einer kompensierten Form. Hier kommt es aufgrund der Erschöpfung des Pankreas sowohl zu einer Hyperinsulinämie und Hyperglykämie als auch meist zu einer Glukosurie (Johnson et al. 2005, Durham et al. 2009). Allerdings kommt diese Form beim Pferd nur selten vor. Tabelle 1 beschreibt die Interpretation der basalen Glukose- und Insulin-Werte bei Pferden nach einer 6-stündigen Hungerperiode (Reed 2018).

Tabelle 1: Interpretation der basalen Glukose- und Insulin-Werte bei Pferden nach einer 6-stündigen Hungerperiode (Reed 2018).

Glukose mg/dl	Insulin µU/ml	Interpretation
< 100	< 20	Keine Anzeichen für eine IR zu diesem Zeitpunkt; Wiederholung des Tests zu einem anderen Zeitpunkt oder Durchführung des cGIT, wenn der Patient phänotypisch einem EMS Pferd entspricht; Adipositas ansprechen und behandeln, falls vorhanden.
< 100	> 20	Normoglykämie mit Hyperinsulinämie; Es liegt eine kompensierte IR vor; Erhöhtes Risiko für Hufrehe liegt vor; Empfehlung eines Planes für Gewichtsmanagement, Futterumstellung und Bewegungsplan.
< 100	> 100	Normoglykämie mit hgr. Hyperinsulinämie; Hgr. noch kompensierte IR; Hohes Risiko für Hufrehe; Strikte Diät sollte eingehalten werden.
> 100	> 20	Der Glukosemetabolismus kann nicht mehr reguliert werden, die Pankreasinsuffizienz schreitet weiter fort; Übergangsstadium zwischen kompensierter und unkompensierter IR liegt vor.
> 120	< 20	Glukosemetabolismus nicht mehr reguliert, Pankreasinsuffizienz noch weiter fortgeschritten; Unkompensierte IR; Sehr hohes Risiko für Hufrehe; Test auf das Vorliegen von Glukosurie (V. a. Diabetes Mellitus).

2.2.1.2.2. Fettleibigkeit

Bezeichnend beim Equinen metabolischen Syndrom sind die Fettdepots. Diese können regional oder generalisiert auftreten (Frank et al. 2010). Die verminderte Insulinsensitivität steht in den meisten Fällen in einem direkten Zusammenhang mit dem Anstieg des „Body Condition Score“ (BCS) und dem Körperfettgehalt (Vick et al. 2007). Allerdings gibt es auch Fälle des Equinen metabolischen Syndroms, die phänotypisch kein Bild der Fettleibigkeit aufweisen (Frank et al. 2010).

Bei einer Fettleibigkeit kommt es nicht nur zu einer Hypertrophie der Adipozyten, sondern auch zu einer Proliferation, die die Anzahl der Adipozyten ansteigen lässt (Schwelger 2016).

Übergewichtige Pferde scheinen eine Prädisposition für die Entwicklung einer Hufrehe und einer Hyperlipidämie zu haben (Wyse et al. 2008).

Das Fettgewebe ist ein endokrines Organ, das Adipokine und Entzündungsmediatoren freisetzt. Eine vermehrte Freisetzung bzw. eine abnormale Regulation der Adipokine wird häufig bei fettleibigen Tieren beobachtet (Radin et al. 2009). Zu den Adipokinen gehören u.a. Leptin und Adiponektin (Radin et al. 2009). Zu den Entzündungsmediatoren gehören die pro-inflammatorischen Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) (Rasouli und Kern 2008).

Leptin wird durch den Energieverbrauch reguliert, sodass die Konzentration eng mit der Körpermasse korreliert (Kearns et al. 2006, Lam und Lu 2007). Es fungiert als Mediator zum zentralen Nervensystem. Bindet es im Gehirn, wird das Appetitgefühl reduziert und der Energieverbrauch gesteigert (Houseknecht und Portocarrero 1998).

In einer Studie von Morgan et al. zeigten 51/188 Ponies (Australische Ponies, Welsh Mountain Ponies/Cobs, Connemara Ponies, Shetland Ponies) eine Hyperinsulinämie. Die Hyperinsulinämie korrelierte mit steigendem Alter, zusätzlicher Fütterung und einer erhöhten Leptin- und Triglyzerid(TG)-Konzentration (Morgan et al. 2014).

Die Adiponektine haben anti-inflammatorische Eigenschaften und einen positiven Effekt auf die Insulinsensitivität (Hopkins et al. 2007). Eine Studie an Rhesusaffen zeigte, dass die Plasmakonzentration von Adiponektin signifikant mit der insulinabhängigen Glukoseaufnahme korreliert. Je niedriger die Konzentration im Plasma, desto geringer ist die insulinabhängige Glukoseaufnahme. Das heißt, dass die Plasma Adiponektin-Konzentration mit dem Fortschreiten einer Insulinresistenz fällt (Hotta et al. 2001). Eine in vitro Studie zeigte, dass die Fettleibigkeit die Expression der Adiponektin-Rezeptoren verringert und somit auch die Sensitivität für Adiponektin. Dies führt zu einer Insulinresistenz, die in einem Teufelskreis endet (Kadowaki und Yamauchi 2005).

In der Humanmedizin wurde festgestellt, dass eine erhöhte entzündliche Zytokin-Konzentration eine direkte Rolle im Entwicklungsgeschehen einer Fettleibigkeit assoziierten Insulinresistenz spielt. Bei Pferden wurde festgestellt, dass die Insulinsensitivität sinkt, wenn der Body Condition Score und der prozentuale Körperfettanteil ansteigen. Gleichzeitig steigen die Entzündungsfaktoren IL-1 und TNF- α an und IL-6 sinkt. Somit ist ein Zusammenhang zwischen der Fettleibigkeit und dem Anstieg der entzündlichen Faktoren bestätigt. Auch die Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen Fettleibigkeit, einem Anstieg entzündlicher Zytokine und der Insulinsensitivität beim Pferd besteht, wird unterstützt (Vick et al. 2007). Das Fettgewebe und die Makrophagen sezernieren nicht nur die Adipokine, sondern auch proinflammatorische Zytokine (Fulop et al. 2006). Beim Menschen zeigt v.a. das abdominale

Fett endokrine Aktivität (Fulop et al. 2006), beim Pferd v.a. das Nackenfett (Bruynsteen et al. 2013). Diese proinflammatorischen Zytokine führen zu einer unterschwellig, sich selbst unterhaltenden Entzündungsreaktion (Rasouli und Kern 2008, Manteiga et al. 2013). Die Lipolyse wird beschleunigt und der Anteil an freien Fettsäuren im Blutkreislauf erhöht. Hierdurch entstehen vermehrt Adipositas bedingte Krankheiten (Manteiga et al. 2013). Post mortem werden häufig Lipide in den Hepatozyten eingelagert gefunden (Frank 2011). Im Muskel- und Fettgewebe gehört GLUT-4 zu den insulinabhängigen Glukoserezeptoren, die für die Glukoseaufnahme in die Zelle mitverantwortlich sind. Nach Waller et al. ist dieser Rezeptor bei insulinresistenten Pferden auf der Zelloberfläche von Muskel- und Fettgewebe weniger exprimiert. Vesikel mit GLUT-4 im Zytoplasma werden nach einer Aktivierung über die Insulin-Signalkaskade zur Plasmamembran transportiert. Studien zeigen, dass diese Translokation bei insulinresistenten Pferden beeinträchtigt ist (Frank 2011, Waller et al. 2011). Die intrazelluläre Akkumulation von Lipiden in der Leber und den Muskeln führt zu einem Folgeschaden im Insulin-Signalweg. Dies erklärt der Mechanismus der Insulinresistenz bei Fettleibigkeit (Samuel et al. 2010).

2.2.1.3. Erscheinungsbild

2.2.1.3.1. Fettverteilung und Bewertungssysteme

Der Body Condition Score (BCS) nach Henneke et al. beschreibt die individuelle Fettverteilung am Körper und wird in eine Skala von 1 – 9 eingeteilt. Die Einteilung ist in Tabelle 2 aufgeführt, zusammen mit Charakteristika jeder Stufe. Charakteristische Fettansatzstellen sind im Bereich des Ligamentum nuchae, des Schweifrübenansatzes, hinter der Schulter, im Bereich des Präputiums bzw. des Gesäuges (Frank et al. 2010), sowie am Widerrist, über den Rippen und im caudalen Rückenbereich (Henneke et al. 1983) (Abbildung 1).

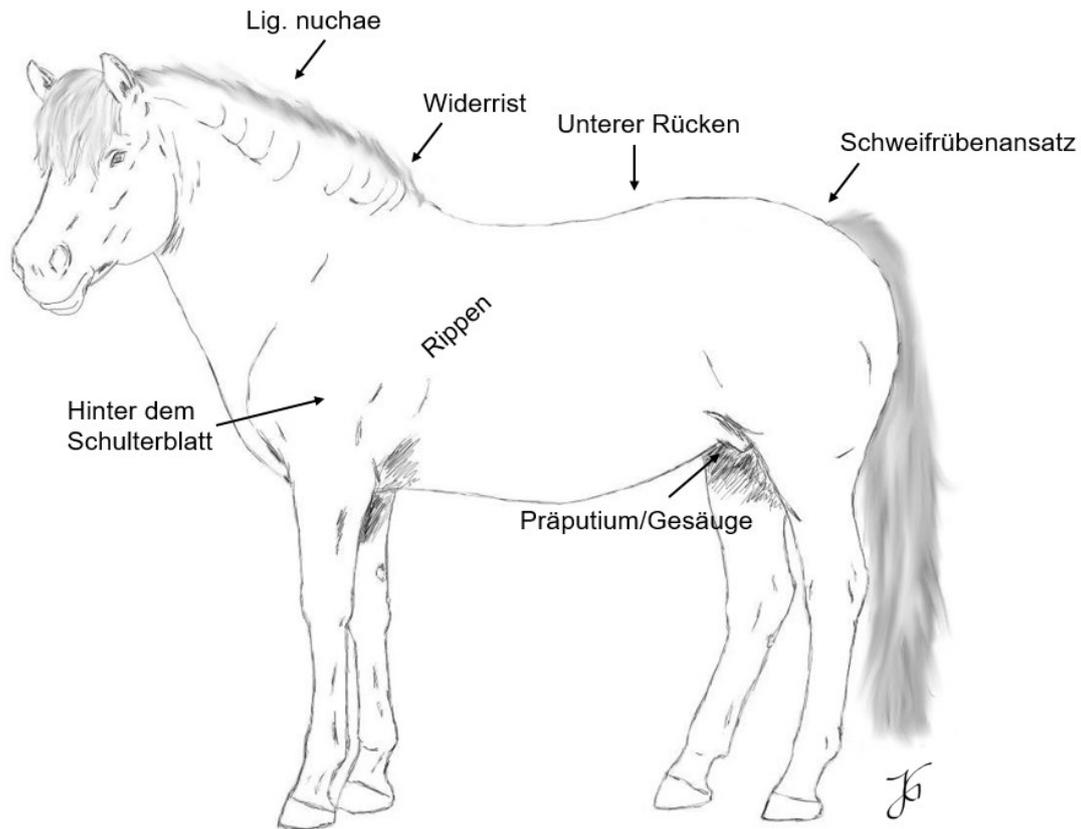


Abbildung 1: Fettansatzstellen nach Henneke et al. (1983) und Frank et al. (2010).
Illustration von Gernhardt (2021).

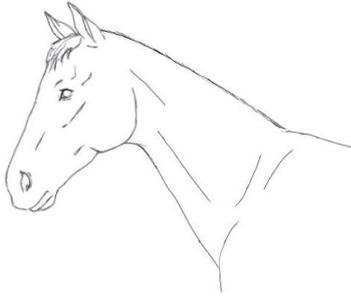
Tabelle 2: Body Condition Score (BCS 1-9) nach Henneke et al. (1983).

<u>BCS</u>	<u>Beschreibung</u>
1. Ausgehungert	Abgemagert; Vorstehende Dornfortsätze, Rippen, Schweifansatz, Hüfthöcker und Sitzbeinhöcker; Knochenstrukturen an Widerrist, Schultern und Hals erkennbar; Keine Fettgewebe fühlbar.
2. Sehr dünn	Abgemagert; Dünne Fettschicht bedeckt Basis der Dornfortsätze; Querfortsätze der Lendenwirbel fühlen sich abgerundet an; Dornfortsätze, Rippen, Schweifansatz und Hüft- und Sitzbeinhöcker vorstehend; An Widerrist, Schultern und Hals sind Knochenstrukturen schwach erkennbar.
3. Dünn	Fettschicht reicht über die halbe Höhe der Dornfortsätze; Querfortsätze nicht fühlbar; Dünne Fettschicht über den Rippen; Dornfortsätze und Rippen gut zu sehen; Schweifansatz

	vorstehend, aber optisch können keine einzelnen Wirbel abgegrenzt werden; Die Hüfthöcker erscheinen abgerundet, aber leicht erkennbar; Sitzbeinhöcker nicht abzugrenzen; Widerrist, Schultern und Hals markiert.
4. Mäßig dünn	Kontur des Rückgrats noch leicht erkennbar, Kontur der Rippen leicht durchscheinend; Schweifansatz je nach Körperbau vorstehend, in der Umgebung ist Fettgewebe fühlbar; Hüfthöcker nicht klar erkennbar; Widerrist, Schultern und Hals markiert.
5. Normal	Rücken ist eben; Rippen können optisch nicht unterschieden werden, sind aber gut zu fühlen; Fett um den Schweifansatz fühlt sich weich an; Seitlich an Widerrist und Hals sowie hinter den Schultern beginnt Fettansatz.
6. Mäßig dick	Leichte Rinne entlang des Rückens möglich; Fett über den Rippen fühlt sich schwammig an; Fett um den Schweifansatz fühlt sich weich an; Seitlich an Widerrist und Hals sowie hinter den Schultern beginnt Fettansatz.
7. Dick	Rinne am Rücken möglich; Einzelne Rippen fühlbar, aber einzelne Interkostalräume füllen sich fühlbar mit Fett; Fett um Schweifansatz ist weich; Sichtbare Fettdepots am Widerrist, hinter den Schultern und am Hals.
8. Fett	Rinne am Rücken; Rippen sind schwierig zu fühlen; Fett um den Schweifansatz sehr weich; Gebiet um den Widerrist und hinter der Schulter mit Fett ausgefüllt; Deutliche Verfettung am Hals; Fettansatz an Innenseite der Hinterbacken.
9. Extrem fett	Deutliche Rinne am Rücken; Fettgeschwülste über den Rippen, um den Schweifansatz, entlang des Widerrists, hinter den Schultern und entlang des Halses; Fettpolster an der Innenseite der Hinterbacken reiben möglicherweise aneinander; Flanken fließend ausgefüllt.

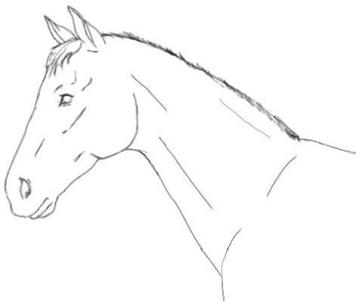
Der Cresty Neck Score (CNS) ist eine hilfreiche Methode zur Beurteilung der Adipositas am Hals (Carter et al. 2009). Das Nackenfett ist das hormonell aktivste Fettdepot, denn die Expression von IL-1 β und IL-6 ist im Nackenfett deutlicher ausgeprägt als in anderen Depots

(Burns et al. 2010). Carter et al. zeigten, dass die Halshöhe oder der Halsumfang in Bezug zur Körpergröße ein hilfreiches morphometrisches Mittel ist (Carter et al. 2009). Dieses Einteilungssystem ist in Abbildung 2 dargestellt.



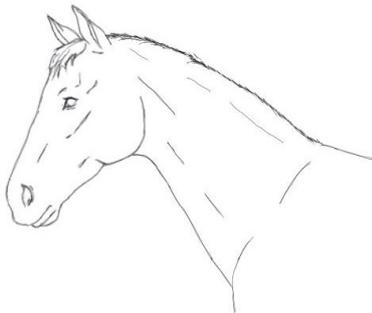
CNS 0

Kein Kamm (Gewebe über dem ligamentum nuchae) ersichtlich. Kein Kamm fühlbar.



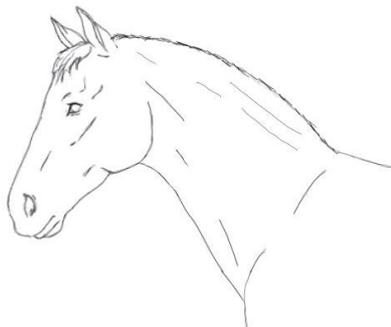
CNS 1

Kein Kamm ersichtlich, aber eine leichte Füllung ist fühlbar.



CNS 2

Erkennbarer Kamm; Das Fett ist vom Kopf bis zum Widerrist gleichmäßig verteilt; Der Kamm lässt sich gut in einer Hand halten und von einer zur anderen Seite biegen.



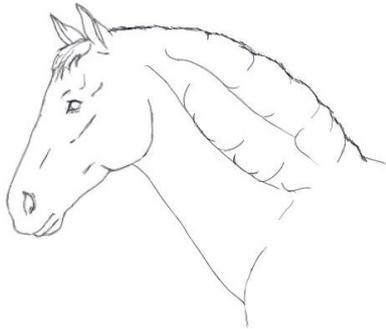
CNS 3

Der Kamm ist vergrößert und verdickt, sodass das Fett vorwiegend in der Mitte des Nackens und weniger in Richtung Kopf und Widerrist verteilt ist; Es entsteht ein hügeliges Erscheinungsbild; Der Kamm füllt die gesamte Hand und verliert die seitliche Flexibilität.



CNS 4

Der Kamm ist deutlich vergrößert und verdickt und kann nicht länger in eine Hand genommen werden oder von einer Seite zur anderen Seite bewegt werden; Der Kamm kann Falten senkrecht zur Oberlinie aufweisen.



CNS 5

Der Kamm ist so groß, dass er permanent auf eine Seite fällt.

Jb

Abbildung 2: Cresty Neck Score (CNS 1-5) nach Carter et al. (2009), Illustration von Gernhardt (2021).

2.2.1.3.2. Hufrehe

Hufrehe ist eine der meistgefürchteten Folge des Equinen metabolischen Syndroms (Durham et al. 2019). 90% aller Hufrehe-Erkrankungen sind Anzeichen eines endokrinen Krankheitsbildes (Morgan, Keen, and McGowan 2015).

Der Zusammenhang zwischen dem Equinen metabolischen Syndrom und der Entstehung einer Hufrehe ist noch nicht endgültig geklärt. Hufrehe ist eine Erkrankung der Zehe und ist bekannt für eine multifaktorielle sowie komplexe Ätiologie. Die Entstehung kann metabolische, entzündliche, traumatische oder vaskuläre Gründe haben (Fulop et al. 2006, Vick et al. 2007, Wylie et al. 2013).

Hauptrisikofaktor für eine Hufrehe ist in diesem Zusammenhang die Insulindysregulation (Burns 2016). Aufgrund dieser endokrinen Funktionsänderung besteht ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Hufrehe (Geor and Frank 2009). In verschiedenen experimentellen Studien wurde eine Hyperinsulinämie bei gesunden Ponies und Pferden als Auslöser für eine Hufrehe herausgestellt (Asplin et al. 2007, de Laat et al. 2010). In der experimentellen Studie von Asplin et al. wurden Ponies ohne Anzeichen einer Hufrehe in eine Behandlungsgruppe

und in eine Kontrollgruppe eingeteilt. Die Kontrollgruppe wurde mit einer Kochsalzlösung infundiert und die Behandlungsgruppe mit humanem Insulin und Glukose. Alle Ponies der behandelten Gruppe entwickelten Anzeichen einer Hufrehe, sowohl klinisch als auch histologisch (Asplin et al. 2007). Aufgrund der häufig assoziierten Insulinresistenz können die vasoregulatorischen Aufgaben des Insulins nicht mehr der Physiologie entsprechend ausgeführt werden (Muniyappa, Iantorno, and Quon 2008). Dies kann durch eine verstärkte Vasokonstriktion/ Hypertension zu einer Hypoperfusion im Endstromgebiet des Hufes führen und eine Hufrehe auslösen (Kumeda and Inaba 2005). Morgan et al. fanden heraus, dass die vaskuläre Dysfunktion im Zusammenhang mit einer endokrinen Hufrehe-Erkrankung systemischer Natur und nicht ein lokales Problem im Pferdehuf ist (Morgan et al. 2016). Es ist bekannt, dass bei einer kurzzeitigen Hyperinsulinämie eine vermehrte Produktion an Endothelin-1 resultiert, weshalb es zu einer erhöhten vaskulären Resistenz in der Zehe der Pferde kommt (Gauff, Patan-Zugaj, and Licka 2013). Eine erhöhte Insulinzirkulation über einen Zeitraum von 2-3 Tagen kann eine Hufrehe bei gesunden Ponies auslösen – deshalb ist es naheliegend, dass die unphysiologische Insulinkonzentration eine direkte Rolle in der Pathogenese einer Hufrehe spielt (Geor 2008). Des Weiteren kann ein Missverhältnis auf intrazellulärer Ebene zwischen Magnesium und Calcium dazu führen, dass der Gefäßtonus erhöht ist (Kumeda und Inaba 2005).

Ein weiterer Ansatz für die Entwicklung einer endokrinopathischen Hufrehe kann eine überschießende Entzündungsreaktion sein, die durch die vermehrte endokrine Aktivität des Fettgewebes entstehen kann. Dieses sendet, wie bereits erklärt, proinflammatorische Zytokine aus. Somit kann die Hufrehe auch aufgrund einer überschießenden Entzündungsreaktion zustande kommen (Elzinga et al. 2017). Holbrook et al. zeigten, dass bei hyperinsulinämischen Pferden eine Erhöhung von freigesetzten Sauerstoffradikalen durch die neutrophilen Granulozyten zu einem erhöhten Risiko für Pferde mit dem metabolischen Syndrom, an Hufrehe zu erkranken, führt (Holbrook et al. 2012).

2.2.1.4. Diagnostik

Es gibt verschiedene dynamische Tests zur Diagnostik einer Insulindysregulation/-resistenz. Man unterscheidet die intravenösen von den oralen dynamischen Tests.

2.2.1.4.1. Dynamische Tests

Tabelle 3: Dynamische Tests im Überblick in Anlehnung an das Handout der Roadshow 2019 von Boehringer Ingelheim "Insulin Dysregulation Diagnostik und Management bei EMS und PPID".

Intravenöse Tests			
Insulinresistenz			
FSIGTT = frequently sampled insulin-modified i.v. glucose tolerance test (Toth et al. 2009, Dunbar et al. 2016)	EHC = euglycemic-hyperinsulinemic clamp (Toth et al. 2009)	IRT = Insulin Response Test (Eiler et al. 2005) (Bertin und Sojka-Kritchevsky 2013) (Caltabilota et al. 2010)	cGIT = Kombiniertes Glukose-Insulin-Toleranztest (Eiler et al. 2005)

Orale Tests			
Insulindysregulation			
Oraler Sugar Test (OST)		Oraler Glukose Test (OGT)	
Dänischer Glukose Syrup	Corn Sirup	Über NSS	In-feed

In Tabelle 3 ist eine Übersicht der verschiedenen intravenösen und oralen dynamischen Tests aufgeführt. Ein großer Vorteil der parenteralen Tests ist, dass der Gastrointestinaltrakt umgangen wird und die Absorption dort keine Rolle spielt (Marks et al. 1991, Duhlmeier et al. 2001, Morgan et al. 2016). Die oralen Tests werden durch die Magenentleerung und die Glukoseabsorption im Dünndarm beeinflusst (Kronfeld et al. 2005).

In der Labordiagnostik gelten der „frequently sampled insulin-modified intravenous glucose tolerance test“ (FSIGTT) und die „euglycemic-hyperinsulinemic clamp (EHC) method“ als Goldstandard zur Diagnostik einer Insulinresistenz (Dunbar et al. 2016).

Bei dem FSIGTT wird dem Pferd eine 50 %ige Dextrose-Lösung intravenös (i.v.) appliziert (150 mg/kg KGW). Hierzu bekommt das Pferd zwei venöse Zugänge gelegt. Über den einen erhält es die zu verabreichende Dextrose und das Insulin, über den anderen werden die Blutproben entnommen. Der Zeitpunkt (ZP) 0 definiert den Zeitpunkt der Dextrose-Injektion. 10, 5 und 1 Minute vor der Dextrose-Applikation, sowie 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 19, 22, 23, 24, 25, 27, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 180 Minuten nach der Dextrose-Gabe werden Blutproben gesammelt. Hieraus werden die Glukose-Werte bestimmt. 20 Minuten nach der Dextrose-Gabe wird Insulin (0,1 IE/kg KGW i.v.), das mit 3 ml einer 0,9%igen NaCl-Lösung versetzt ist, appliziert. Die Insulin-Konzentration wird zu den gleichen Zeitpunkten bestimmt bis auf 10 und 5 Minuten vor der Dextrose-Applikation und 23 bzw. 24 Minuten nach der Applikation (Toth et al. 2009, Dunbar et al. 2016). Mithilfe der „minimal model

analysis“ kann im Anschluss durch ein computergesteuertes mathematisches System die Insulinsensitivität anhand der durch den FSIGTT gemessenen Insulin- und Glukosewerte ermittelt werden (Bergman et al. 1987).

Es gibt weitere Methoden, um die Beta-Zell-Empfindlichkeit gegenüber Glukose und die Gewebeermpfindlichkeit gegenüber Insulin quantifizieren zu können. Man spricht bei ersterem von der „hyperglycemic clamp technique“ und beim zweiten von der „euglycemic insulin clamp technique“. Bei der „hyperglycemic clamp technique“ wird die Plasmaglukosekonzentration akut auf bis zu 125 mg/dl über den Basalspiegel erhöht und durch anschließende Glukose-Infusionen aufrechterhalten. Somit ist die Glukose-Infusionsrate ein Index für den Glukosestoffwechsel (DeFronzo et al. 1979). Diese Methode ist allerdings sehr labor- und zeitintensiv (Muniyappa et al. 2008). Bei der „euglycemic insulin clamp technique“ wird die Plasma-Insulin-Konzentration akut erhöht und durch eine konstante Insulin-Infusion bei ca. 100 μ U/ml gehalten. Die Plasmaglukose-Konzentration wird durch eine variable Glukose-Infusion konstant gehalten, sodass die Glukoseinfusionsrate, aufgrund des euglykämischen Zustandes, der Glukoseaufnahme aller Gewebe im Körper entspricht und somit ein Maß für die Gewebeermpfindlichkeit auf exogenes Insulin darstellt (DeFronzo et al. 1979). EHC ist die Kombination aus beidem (Pratt et al. 2005).

Diese Methoden sind für die Praxis allerdings zu kosten-/zeitintensiv und werden deshalb routinemäßig in der Praxis nicht durchgeführt (Durham et al. 2019).

In einer Studie von Dunbar et al. wurde festgestellt, dass der kombinierte Glucose-Insulin-Toleranztest (cGIT) eine besonders gute Sensitivität und Spezifität aufweist (Dunbar et al. 2016). Der cGIT ist eine gängige Methode. Die Pferde unterliegen einer Futterrestriktion (6 Stunden) und haben über Nacht nur Zugang zu Wasser. Über einen venösen Zugang werden nach vorherigem Verwerfen einer 10 ml Spritze Blut die Basalwerte von Glukose und Insulin bestimmt. Anschließend wird dem Pferd eine Dextrose-Lösung (150 mg/kg KGW) zügig (<1 Minute) i.v. verabreicht. Innerhalb der folgenden 6 Sekunden wird ein Insulin-Bolus (0,1 IE/kg KGW), welcher in 3 ml isotonischer Kochsalzlösung gelöst ist, i.v. appliziert. Anschließend wird mit heparinierter Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) gespült. Ausgewählte Proben werden auf die Insulinkonzentration bestimmt. Zu folgenden Zeitpunkten werden Blutproben gesammelt und die Glukose-Werte bestimmt: 0, 1, 5, 15, 25, 35, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150 Minuten (Eiler et al. 2005).

In einer Studie von Eiler et al. wurde der cGIT an gesunden Stuten durchgeführt. Hier wurde festgestellt, dass sich nach der intravenösen Applikation von Glukose und Insulin (Humulin R, Eli Lilly Co, Indianapolis, Ind.) ein zweiphasiger Glukose-Verlauf einstellt. Die erste Phase ist gekennzeichnet durch eine sich einstellende Hyperglykämie, die das Maximum nach einer

Minute zeigt. Anschließend fällt die Glukosekonzentration allmählich wieder. Nach ca. 30 Minuten ist der Ausgangswert wieder erreicht. Anschließend beginnt die 2. Phase. Hier unterschreitet die Glukosekonzentration die Basallinie, sodass sich eine Hypoglykämie einstellt. Das Minimum ist nach ca. 75 Minuten erreicht. Anschließend nähert sich die Glukosekonzentration allmählich wieder der Basallinie an (Eiler et al. 2005). Abbildung 3 zeigt diesen zweiphasigen Verlauf und die Wiederholbarkeit des cGITs. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass die Glukoseverläufe im Vergleich zu den Insulinkonzentrationen schlechter reproduzierbar sind (Brojer et al. 2013).

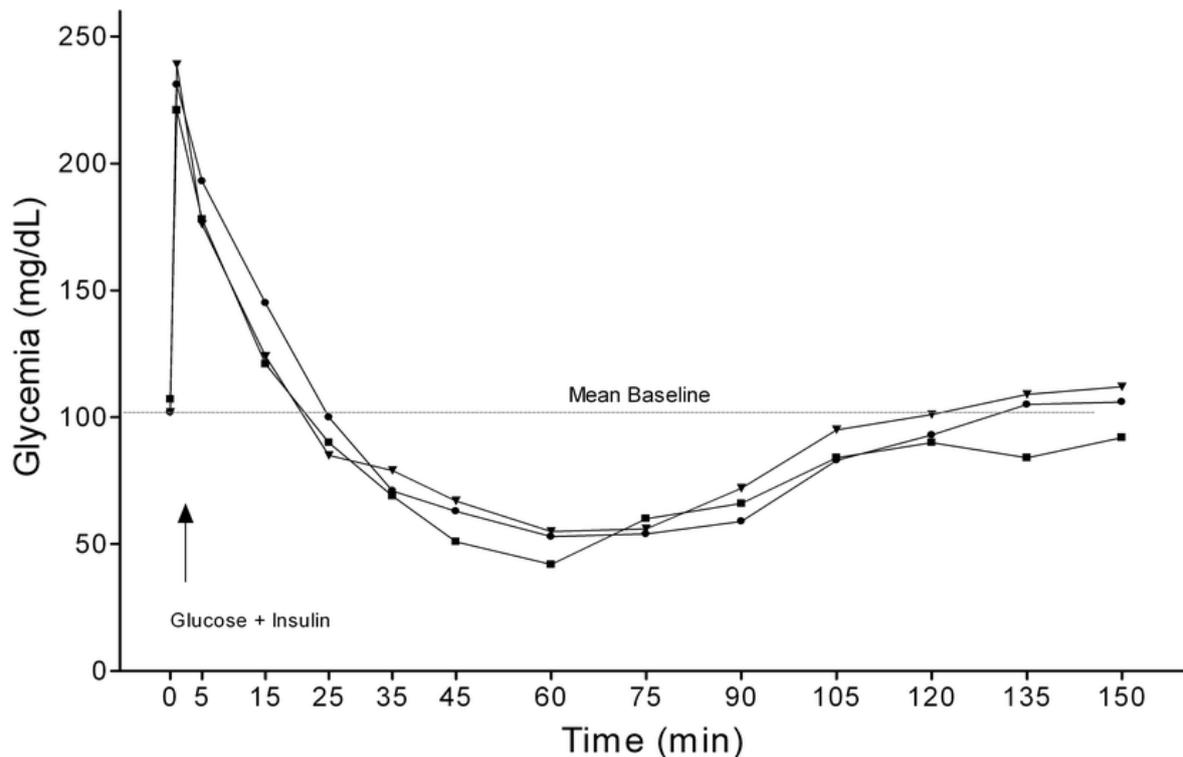


Abbildung 3: Zweiphasiger Verlauf des cGITs und Wiederholbarkeit (Eiler et al. 2005).
 In dieser Studie wurde die Wiederholbarkeit des cGITs geprüft. Die Abbildung zeigt den Verlauf des cGITs eines Pferdes, das dreimal in einem zweiwöchigen Intervall einem cGIT unterzogen wurde.

Beeinflusst wird dieser Kurvenverlauf durch bestimmte Medikamente. Xylazin oder eine Stressexposition können den Kurvenverlauf verlangsamen bzw. zu erhöhten Glukosebasalwerten führen (Eiler et al. 2005).

Die Hypothese, dass ein saisonaler Unterschied in den Ergebnissen des cGIT vorliegt, konnte nicht bestätigt werden. Es wurden keine klinisch relevanten Differenzen bei den gesunden und normal alten untersuchten Pferden gefunden (Funk et al. 2012).

Als weiterer intravenöser, dynamischer Test wird der „Insulin Response Test“ (IRT) von Caltabilota et al. beschrieben (Caltabilota et al. 2010). Über einen venösen Zugang erhalten die Pferde eine einmalige Gabe von humanem Insulin in einer Dosierung 0,01 IE/kg KGW. In bestimmten Zeitintervallen werden Blutproben entnommen. Bei gesunden Pferden sollte die Blutglukose nach der Insulinapplikation um 50 % sinken und eine Hypoglykämie bewirken. Innerhalb der nächsten zwei Stunden sollte sich die Glukose wieder im physiologischen Bereich befinden (Eiler et al. 2005, Caltabilota et al. 2010, Bertin und Sojka-Kritchevsky 2013).

Es gibt neben den intravenösen dynamischen Tests Möglichkeiten der oralen Testverfahren. Diese können auf zwei verschiedene Weisen durchgeführt werden. Entweder wird die Glukose oder ein Ersatz wie das Karo Light Sirup über das Futter (Smith et al. 2016) gestreut, in Wasser aufgelöst und per Nasenschlundsonde (Warnken et al. 2018a) oder über eine Spritze in das Pferdemaul eingegeben.

Die Möglichkeit des OST wird folgendermaßen beschrieben (Schuver et al. 2014): Hier wird eine 0-Wert Bestimmung über das Blut (aus V. Jugularis) durchgeführt und anschließend Karo-Light-Korn-Sirup per os in einer Dosierung von 0,15 ml/kg KGW (Frank 2011) verabreicht. Die Blutentnahme wird 30, 60, 90 und 120 Minuten nach der Applikation durchgeführt. Dies dient der Blutglukose- und Seruminsulin-Konzentrations-Bestimmung (Dunbar et al. 2016). Ergebnisse einer Vorstudie zeigten, dass bei insulinresistenten Pferden die Insulin-Konzentration 60 µU/ml zum Zeitpunkt 60, 75 und 90 überschreitet - deshalb sollte innerhalb dieses Zeitraumes eine Blutentnahme durch den Tierarzt durchgeführt werden (Frank 2011). Dieser Test kann auch anstelle des Karo-Light-Korn-Sirup mit einem skandinavischen Glukose-Sirup durchgeführt werden (Lindase et al. 2016).

Bei der Durchführung des OGT kann entweder die Glukose über das Futter aufgenommen (de Laat et al. 2016, Smith et al. 2016) oder über eine Nasenschlundsonde (Ralston 2002, Warnken et al. 2016, Warnken et al. 2018a) verabreicht werden. Bei allen möglichen Testvarianten werden basale Glukose- und Insulin-Werte nach einer 8-stündigen Nahrungskarenz bestimmt. Bei dem OGT über die Nahrung wird Glukose-Pulver (1 g/kg KGW (Smith et al. 2016) bzw. 0,75 g/kg KGW (de Laat et al. 2016)) verabreicht. Anschließend werden stimulierte Blutproben zur Ermittlung der Glukose und des Insulins genommen. Bei dem OGT mittels Nasenschlundsonde wird 1 g/kg KGW Glukose-Pulver in 2 l Wasser gelöst verabreicht. Auch hier werden die stimulierten Glukose- und Insulin-Konzentrationen im Blut bestimmt (Warnken et al. 2016, Warnken et al. 2018a).

2.2.1.5. Ansätze zur Behandlung und Prophylaxe des Equinen metabolischen Syndroms

Die Insulinresistenz und Hyperinsulinämie sind Risikofaktoren für die Entstehung einer Hufrehe und stehen daher im Fokus der Behandlung (Tinworth et al. 2010b). In der Literatur werden einige Ansätze zur Behandlung und Prophylaxe beschrieben. Allerdings wird die Behandlung einer Insulinresistenz kontrovers diskutiert (Tinworth et al. 2010b).

Bisher gibt es noch keine für Pferde zugelassenen Medikamente, es können jedoch humanmedizinische Medikamente umgewidmet werden (Wylie und Collins 2010).

Metformin ist ein Antidiabetikum, das zur Gruppe der Biguanide gehört. Es wird in der Humanmedizin bei einer Insulinresistenz eingesetzt. In einer Studie von Durham et al. haben 18 Pferde und Ponies, die insulinresistent und wiederkehrend mit einer Hufrehe aufgefallen waren, alle 12 Stunden 15 mg/kg KGW Metformin verabreicht bekommen. Hier zeigte sich eine verbesserte Insulinsensitivität und eine verminderte beta-Zell Sekretion des Pankreas nach der Behandlung mit Metformin. Den größten Effekt gab es innerhalb der ersten 14 Tage (Durham et al. 2008).

In einer Studie von Tinworth et al. hingegen wurde bei insulinresistenten Ponies/Pferden keine positive Beeinflussung der Insulinsensitivität festgestellt. Die Ponies bekamen 15 mg/kg KGW Metformin zweimal täglich über einen Zeitraum von 14 Tagen oral eingegeben. Dazu vergleichend gab es eine Kontrollgruppe, die ein Placebo bekam. Beide Gruppen mussten sich vor der Applikation und nach dem Applikationszeitraum einem FSIGTT unterziehen (Tinworth et al. 2012). Einige Studien zeigen, dass Metformin keine gute orale Bioverfügbarkeit (Hustace et al. 2009, Tinworth et al. 2010a, Tinworth et al. 2012) bei Pferden hat und auch eine Applikation über einen längeren Zeitraum nicht den gewünschten Effekt erbringt (Tinworth et al. 2010a).

Zudem sollte versucht werden an der Nahrungsrestriktion und der Steigerung der physischen Aktivität anzusetzen. McGowan et al. fanden in einer Studie heraus, dass eine Nahrungsrestriktion des Raufutters auf 1,25 % der Körpermasse als Trockensubstanz zu empfehlen ist. Es ist empfehlenswert z.B. das Heu in kaltem Wasser zu waschen. Die Zugabe von Vitaminen kann hilfreich sein, um ihren Verlust über die Waschung auszugleichen, sowie die Zugabe von Mineralien. So kann eine möglichst schnelle Verbesserung der Körperkondition und der Insulinsensitivität bei Pferden mit dem metabolischen Syndrom angestrebt werden (McGowan et al. 2013).

Das Medikament Levothyroxin kann einen Nutzen in der Therapie der Insulinresistenz und der Fettleibigkeit haben. Levothyroxin ist ein synthetisches Thyroid-Hormon und gehört zu den

Schilddrüsenhormonen (Frank et al. 2005, Frank et al. 2008a, Frank et al. 2008b). Levothyroxin beschleunigt die Gewichtsreduktion durch einen erhöhten Grundumsatz. Zusätzliche Bewegung und Haltungsoptimierungen sind förderlich (Frank et al. 2005). In einer Studie von Frank et al. führte eine Verabreichung von 24–96 mg Levothyroxin/Tag bei gesunden Mix- und Quarter Horse Stuten zur Verringerung der Lipidkonzentration im Blut, einer Verbesserung der Insulinsensitivität, sowie einer gesteigerten Beseitigung von Insulin (Frank et al. 2005). Eine Langzeitstudie über 48 Wochen zeigte bei einer täglichen Gabe von 48 mg Levothyroxin/Tag bei gesunden Stuten keinen negativen Effekt (Frank et al. 2008b). In Deutschland gibt es bisher keine für Pferde zugelassenen Präparate.

Pioglitazon ist ein Antidiabetikum, das zur Gruppe der Glitazone gehört. In der Humanmedizin wird es bei Diabetes-Patienten eingesetzt. Pioglitazone sind synthetische Aktivatoren des nukleären Rezeptors PPAR γ („peroxisome proliferator activator receptor γ “) und kann so beim Menschen die durch Fettleibigkeit ausgelöste Entzündungsreaktion vermindern (Willson et al. 2001, Wearn et al. 2012). Ähnliche Effekte werden beim Pferd vermutet, sind aber bisher nicht eingehender untersucht worden. In einer Untersuchung wurde gesunden, nicht tragenden Vollblutstuten 1 mg/kg KGW Pioglitazon über 14 Tage über eine Spritze oral in einem 24-stündigen Intervall über 11 Gaben verabreicht und die Ergebnisse mit einer Kontrollgruppe verglichen. Es konnte kein negativer Effekt festgestellt werden. Das pharmakokinetische Profil bei Pferden scheint ähnlich dem des Menschen zu sein, wobei die Konzentration im Plasma noch unter der beim Menschen bekannten therapeutischen Plasmakonzentration lag (Wearn et al. 2012). Neuere Studien von Legere et al. erbrachten vielversprechende Ergebnisse. 15 erwachsene Pferde/Ponies bekamen alle 24 Stunden 2 mg/kg KGW Pioglitazone p.o. über 28 Tage verabreicht. Es konnte ein positiver Effekt von Pioglitazone auf den „Oral Sugar Test“ und auf die Adiponektin-Konzentration festgestellt werden. Hier bedarf es weiterer Untersuchungen (Legere et al. 2019).

Einen weiteren Ansatz stellt das Velagliflozin dar. Velagliflozin gehört zu den Natrium-Glukose Co-Transporter 2 (SGLT-2) Hemmern. Es scheint als Behandlungsmöglichkeit einer Insulindysregulation und zur Vorbeugung einer Hufrehe-Erkrankung vielversprechend zu sein (Meier et al. 2018). In der Humanmedizin fand man heraus, dass durch die Applikation von SGLT-2 Hemmern die Reabsorption der Glukose durch die Niere verringert wird. Somit wird die Ausscheidung über die Niere erhöht und die Insulinantwort auf eine Hyperglykämie verringert (Chao 2014). In einer Studie von Meier et al. wurden 49 Ponies in eine Behandlungsgruppe (n=12) und eine Kontrollgruppe (n=37) verteilt. Alle Ponies bekamen für 3 Wochen Luzerne-Heu und anschließend für 18 Tage 12 g nicht-strukturelle Kohlenhydrate/kg KGW pro Tag gefüttert. Die Behandlungsgruppe bekam 0,3 mg/kg KGW Velagliflozin einmal täglich oral verabreicht über den Zeitraum der Fütterung mit nicht-

strukturellen Kohlenhydraten und 21 Tage zuvor. 14 Ponies aus der Placebogruppe entwickelten zum Teil eine Hufrehe, hingegen hatte in der Verumgruppe keines der Ponies Anzeichen einer Hufrehe. Das Präparat wurde gut toleriert. In der Verumgruppe entwickelte sich als Konsequenz keine Hypoglykämie (Meier et al. 2018). In einer weiteren Studie von Meier et al. wurde der Effekt einer 16 Wochen Therapie mit Velagliflozin an Ponies mit einer Insulindysregulation getestet. Die Sicherheit des Präparates wurde bestätigt. Außerdem wurde in der Behandlungsgruppe ein positiver Einfluss auf eine bestehende Hyperinsulinämie gesehen (Meier 2019). In humanmedizinischen Studien neigen die Patienten, die mit SGLT-2 Hemmern behandelt wurden, zu Harnwegsinfekten. Dies ist vermutlich bedingt durch die vermehrte Glukoseausscheidung über den Urin. Außerdem neigen diese Patienten zu einem niedrigen Blutdruck, vermutlich aufgrund eines diuretischen Effekts (List et al. 2009). Diese Beobachtungen konnten bisher beim Pferd nicht gemacht werden.

Die Säulen der momentanen EMS-Behandlung sind eine Kohlenhydratreduktion in Kombination mit Arbeitssteigerung. Diese beiden Komponenten sind essenziell und anzuraten. Allerdings spielt hier die Compliance des Besitzers eine wichtige Rolle. Die Studie von Morgan et al. zeigt, dass ein auf das Pferd zugeschnittenes Bewegungsprogramm und ein angepasster Futterplan bei strikter Umsetzung zu einer Verringerung des Körpergewichtes, Verbesserung des BCS, zu einer signifikanten Reduktion des basalen Insulins, des Insulins beim cGIT nach 45 Minuten und zu einer schnelleren Regulierung der Hyperglykämie führt (Morgan et al. 2016). Allerdings ist diese Herangehensweise nicht für jede Zielgruppe geeignet (Tinworth et al. 2010b), wie z.B. bei einer akuten Hufrehe-Erkrankung, da hier nur ein bedingtes Bewegungsprogramm durchgeführt werden kann.

Die Umweltfaktoren, die eine Hufrehe-Erkrankung zusätzlich zur Insulinresistenz begünstigen, sollten prophylaktisch minimiert werden, z.B. das Grasens auf satten Wiesen, Fütterung von vielen Kohlenhydraten, Zucker und Stärke (Geor 2008).

2.2.2. Metabolisches Syndrom beim Menschen

Das metabolische Syndrom in der Humanmedizin beschreibt die Häufung metabolischer Abnormalitäten, die ein erhöhtes Risiko für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen und einem Diabetes Mellitus Typ II zur Folge hat (Fulop et al. 2006). Die Prävalenz für die Entwicklung des metabolischen Syndroms steigt weltweit rasch an, vor allem wegen der zunehmenden Fettleibigkeit (Bruce und Hanson 2010). Die Entwicklung beruht auf einer multifaktoriellen Krankheitsentstehung, wobei bereits die maternale Fehlernährung das Risiko erhöhen kann, wie auch die Ernährung in den verschiedenen embryonalen

Entwicklungsphasen. Auch eine unausgewogene Ernährung im Alter kann die Entwicklung des metabolischen Syndroms fördern (Bruce und Hanson 2010), sodass die Prävalenz im Alter ansteigend ist (Fulop et al. 2006). Da der Verdacht auf eine genetische Prädisposition besteht, raten Bruce et al. zu einer Aufklärung der Eltern und der werdenden Mütter, um die Ernährung entsprechend anzupassen (Bruce und Hanson 2010). Um diese Annahme zu stärken, müssen allerdings weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Ein großes Problem, das in der menschlichen Population im Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom gesehen wird, sind kardiovaskuläre Erkrankungen (Fulop et al. 2006). Die Wirkung von Insulin im Muskel, Fettgewebe und in der Leber ist in der Literatur genau beschrieben, hingegen die Wirkung im Endothel nicht. Bekannt ist, dass eine Insulinresistenz zu einer endothelialen Dysfunktion führen kann. Insulin induziert normalerweise die Produktion von Stickstoffmonoxid, das vasodilatatorisch wirkt (Jansson 2007). Im Rahmen der Insulinresistenz kann es zu einer Imbalance zwischen dem Vasodilatator Stickstoffmonoxid und dem Vasokonstriktor Endothelin 1 kommen (Harrison 1997, Mather et al. 2004). Das Endresultat ist eine Vasokonstriktion, die zu einer verminderten Durchblutung führt (Jansson 2007). Suzuki et al. zeigten einen signifikanten Zusammenhang zwischen endothelialer Dysfunktion und Insulinresistenz bei Patienten mit Diabetes Mellitus Typ II (Suzuki et al. 2007).

Da das metabolische Syndrom häufig mit einer Fettleibigkeit im Zusammenhang steht (Bruce und Hanson 2010), muss auch die Wirkung des abdominalen Fettgewebes erwähnt werden. Das abdominale Fett verursacht eine geringgradige Entzündungsreaktion. Das Fettgewebe selbst, sowie die Makrophagen sezernieren Adipokine (z.B. Adiponektin und Leptin) und proinflammatorische Zytokine (z.B. TNF- α , IL-6) (Fulop et al. 2006). Außerdem kann im Zusammenhang mit einer Fettleibigkeit die Erhöhung von Proteinen der Gerinnungskaskade einher gehen, wie dem Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) (Fulop et al. 2006). Das proinflammatorische Zytokin TNF- α moduliert die Expression und Produktion von Adipokinen. Es erhöht die Expression von Leptin und verringert die von Adiponektin (Hutley und Prins 2005). Eine Erhöhung des Leptins führt zu einer vermehrten Reaktion des Immunsystems (Lyon et al. 2003) und eine Reduktion des Adiponektins führt dazu, dass es keine Protektion gegenüber dem metabolischen Syndrom bewirken kann (Fulop et al. 2006). Die Erhöhung des PAI-1 trägt zu einer Thrombose bei (Fulop et al. 2006).

2.3. Zusammenfassung der Unterschiede und Gemeinsamkeiten des metabolischen Syndroms beim Menschen und beim Pferd

Tabelle 4: Folgen oder Ursachen für HMS (Humanes metabolisches Syndrom) und EMS.

MENSCH (HMS)	PFERD (EMS)
Kardiovaskuläres Erkrankungsrisiko ↑ (Fulop et al. 2006)	Generalisierte Fettleibigkeit (BCS ≥ 7/9) (Henneke et al. 1983, Frank et al. 2010)
Endotheliale Dysfunktion (Rask-Madsen und King 2007)	Regionale Fettleibigkeit (CNS ≥ 3/5) (Carter et al. 2009, Frank et al. 2010)
Arteriosklerose-Risiko ↑ (Suzuki et al. 2007)	Insulinresistenz (Frank et al. 2010) Insulindysregulation (Durham et al. 2019)
Koronarer Blutfluss ↓ (Tok et al. 2013)	Prädisposition für Hufrehe (Morgan et al. 2015)
Systolischer Blutdruck ↑ (Tok et al. 2013)	Freisetzung von Sauerstoffradikalen (Holbrook et al. 2012)
Taillenumfang ↑ (Tok et al. 2013)	
Magnesiumdefizit im Serum und intrazellulär (Barbagallo und Dominguez 2007, 2015)	

Das Equine metabolische Syndrom zeigt viele Parallelen zum metabolischen Syndrom des Menschen, genauer dem Diabetes Mellitus Typ II (Fulop et al. 2006). In beiden Fällen spielt die Insulinresistenz eine bedeutende Rolle (Frank et al. 2010). Neben den bisher erläuterten pathophysiologischen Gegebenheiten des HMS und EMS, muss die Rolle des Magnesiums hervorgehoben werden.

2.3.1. Magnesiummetabolismus beim Menschen mit metabolischem Syndrom

Bei Menschen, die an Diabetes Mellitus Typ II leiden, wurde ein Magnesiummangel auf intrazellulärer und teils extrazellulärer Ebene festgestellt (Barbagallo und Dominguez 2007, 2015). Ein Magnesiumdefizit wird über das freie intrazelluläre Magnesium bzw. über das ionisierte Magnesium im Plasma definiert (Barbagallo und Dominguez 2007). Dieser Mangel kann durch eine verminderte Aufnahme des Moleküls über die Nahrung bzw. über eine vermehrte Ausscheidung über den Urin zustande kommen (Barbagallo und Dominguez 2015). Hier spielt die Niere eine wichtige Rolle (Sales et al. 2011). Durch eine Hyperglykämie wird

der tubuläre Durchfluss erhöht und die Absorption von Magnesium vermindert, sodass es zu einer erhöhten Ausscheidung von Magnesium über den Urin kommt (Ponder et al. 1990). Ein Plasma-Mg-Wert innerhalb des Referenzbereiches spricht nicht zwingend für eine optimale Mg-Versorgung, denn der Plasmamagnesiumspiegel wird vergleichsweise konstant gehalten, auch wenn auf intrazellulärer Ebene bereits ein Mangel/Defizit vorliegt. Allerdings kann bei einem niedrigen Plasma-Mg-Gehalt von einem Mg-Mangel ausgegangen werden (Kurth 2012). Der Magnesium-Metabolismus spielt eine wichtige Rolle für die Insulinaktivität/-sensitivität (Barbagallo und Dominguez 2007) und somit auch für die Blut-Glukose Kontrolle (Sales et al. 2011). Eine humanmedizinische Studie von Hruby et al. zeigt, dass Patienten mit einer hohen Magnesiumaufnahme ein 15 % niedrigeres Risiko für die Entwicklung eines Diabetes Mellitus Typ II haben (Hruby et al. 2017).

Der Magnesiummangel scheint auch einen direkten Einfluss auf den Gefäßtonus zu haben. Aufgrund der durch den Mangel verursachten abnormen Tyrosinkinase-Aktivität am Insulinrezeptor entsteht eine Membranstabilität, die in einer gesteigerten Calciumkonzentration intrazellulär resultiert (Cowan 1995, Barbagallo et al. 2003, Bruce und Hanson 2010). Somit wird sowohl die Insulinsensitivität verschlechtert (Barbagallo und Dominguez 2015) als auch der Gefäßtonus gesteigert (Barbagallo und Dominguez 2007). Aufgrund dieser Elektrolytimbalance kommt es beim Menschen zu Arrhythmien sowie Muskelkrämpfen (Vormann et al. 1992).

In der Humanmedizin gibt es Studien darüber, dass eine tägliche Magnesium-Supplementierung die Inzidenz des Diabetes Mellitus Typ 2 vermindert (Barbagallo et al. 2003). Man fand zudem heraus, dass der Transport des Magnesiums von extrazellulär nach intrazellulär insulinabhängig ist. Insulin als Therapiemöglichkeit brachte allerdings keinen Erfolg, da die Insulinresistenz eine Glucose- und Magnesiumaufnahme negativ beeinflusst (Alzaid et al. 1995). Ein wichtiger Ansatz ist die Supplementierung von Magnesium, denn die Ergebnisse einer Meta-Analyse haben ergeben, dass die Magnesiumaufnahme mit der Nahrung im Zusammenhang mit dem Risiko der Entwicklung des metabolischen Syndroms steht (Dibaba et al. 2014). Da die intrazelluläre Magnesiummessung als repräsentativer für einen tatsächlichen Magnesiummangel bzw. ein Magnesiumdefizit beschrieben wurde, wurden im Rahmen einer humanmedizinischen Studie von Kurth 19 Probanden mit Diabetes Mellitus Typ II, 300 mg Magnesiumcitrat (Magnesium Diasporal 300, Fa. Protina Pharmaceutical GmbH, Deutschland) über vier Wochen verabreicht und sowohl vor als auch nach der Supplementierung mittels Photospektrometrie der intrazelluläre Magnesiumgehalt in den Leukozyten gemessen. Der intrazelluläre Magnesiumgehalt wurde hierdurch von $0,43 \pm 0,06$ mmol/l ($\bar{x} \pm SD$) auf $0,61 \pm 0,06$ mmol/l ($\bar{x} \pm SD$) gesteigert. Somit erhöhte sich die durchschnittliche intrazelluläre Magnesiumkonzentration signifikant um 0,18 mmol/l (Kurth

2012). Die intrazelluläre Magnesiumkonzentration spiegelt im Gegensatz zur extrazellulären den Magnesiumspiegel im Gewebe wider, denn der überwiegende Teil des Magnesiums ist intrazellulär (35%) und in der Knochenmatrix (60%) zu finden. Im Plasma sind lediglich 1% des gesamten Körpermagnesiums (Vormann 2003).

Es wurden verschiedene Formen von Magnesium am Menschen getestet: Das Magnesiumoxid und das Magnesium-L-Aspartat-HCL sowohl als Granulat als auch in Tablettenform. Die drei verschiedenen Formen werden gut toleriert, können aber eine erhöhte Kotabsatzfrequenz und weicheren Stuhl verursachen. Wegen des unangenehmen Geschmacks wird das Magnesium-L-Aspartat-HCL bevorzugt in Tablettenform angewendet (Muhlbauer et al. 1991).

2.3.2. Magnesiumstoffwechsel beim Pferd mit metabolischem Syndrom

In der Veterinärmedizin gibt es bisher wenige Erkenntnisse über die Auswirkung von Magnesium auf die Insulinsensitivität. Adulte Pferde sollten nach Empfehlungen des National Research Council Committee 12,5 mg/kg KGW elementares Magnesium zu sich nehmen. Bei besonderen Leistungen – wie Trächtigkeit, Laktation oder Sport – liegt der Bedarf bei 30 mg/kg KGW pro Tag. Durch eine Ernährung mit Heu, Gras und Getreide ist eine Unterversorgung über die tägliche Futterration eher unwahrscheinlich (Council 2007). Aber es kann auch beim Pferd zu einer Elektrolytimbalance kommen. Diese kann Auswirkungen auf die Skelettmuskelkontraktion, den vasomotorischen Tonus und die kardiale Erregbarkeit haben. Neuronale Störungen, die sich beim Pferd aufgrund dessen manifestieren, sind nur selten dokumentiert (Stewart 2011).

Die wenigen bisher in der Veterinärmedizin durchgeführten Studien über die Auswirkung von Magnesium auf die Insulinsensitivität bringen sehr unterschiedliche Ergebnisse. Eine Studie von Chameroy et al. ergab keine Verbesserung der Insulinsensitivität bei Pferden. Hier wurde Magnesium als Oxid/Proteinat (8,8 g/Tag) supplementiert (Chameroy et al. 2011). Hingegen zeigte eine Studie von Winter et al. eine Verbesserung der Insulinsensitivität nach einer Supplementierung von Magnesium als Magnesiumaspartat-Hydrochlorid (Winter et al. 2016). In dieser Studie wurden fünf klinisch gesunde Pferde, die keine Anzeichen einer Hufrehe zeigten, auf EMS getestet. Diesen Pferden wurde über 3 Monate einmal täglich 30 mg/kg KGW Magnesiumaspartat-Hydrochlorid oral verabreicht. Bei drei von fünf Pferden war der cGIT nach der Behandlung negativ (Winter et al. 2016). Pferde, die am Equinen metabolischen Syndrom leiden, haben einen signifikant niedrigeren intrazellulären Magnesiumgehalt, der sich allerdings im Normbereich befindet (Winter et al. 2020). Auf zellulärer Ebene wurden bisher

nur wenige Untersuchungen beim Pferd durchgeführt. Winter et al. führten intrazelluläre Magnesiummessungen an Blutlymphozyten durch, sowohl an gesunden als auch an Pferden mit EMS. Der Referenzbereich bei gesunden Pferden wurde auf 0,16 – 0,42 mmol/l festgesetzt (Winter et al. 2020). Bereits in der Humanmedizin ist die bessere orale Bioverfügbarkeit des Magnesiumaspartat-Hydrochlorids bekannt (Muhlbauer et al. 1991). In der Veterinärmedizin zeigten Studien an Katzen und Ratten eine ähnlich positivere Absorption des Magnesiumaspartat-Hydrochlorids durch den Gastrointestinaltrakt (Classen 1973).

2.4. Zusammenhang zur eigenen Fragestellung

Das Equine metabolische Syndrom ist ein zunehmendes Problem in der Pferdepopulation, welches Veterinäre immer wieder an die Grenzen bringt. Fettleibigkeit, Insulinresistenz/-dysregulation und Hufrehe stehen hierbei im Vordergrund (Frank et al. 2010).

Im Hinblick auf die Diagnostik gibt es einige praktikable und sichere Methoden. Vor allem der intravenöse kombinierte Glukose-Insulin-Toleranztest stellt mit seiner hohen Sensitivität und Spezifität einen hilfreichen diagnostischen Test dar, welcher in der Praxis gut durchführbar ist (Dunbar et al. 2016). Allerdings sollten hier die basale und stimulierte Insulinkonzentration immer mit in Betracht gezogen werden, da die Dynamik der Glukose verschiedenen Schwankungen ausgesetzt ist (Brojer et al. 2013).

Hingegen stellt die Behandlung des Equinen metabolischen Syndroms den Praktiker immer wieder vor Probleme. Es gibt momentan kein für Pferde zugelassenes Medikament mit eindeutig nachgewiesener Wirksamkeit (Frank et al. 2005, Frank et al. 2008a, Tinworth et al. 2012, Wearn et al. 2012). Somit sind die Pferde einem unvermeidbaren Risiko einer Hufrehe-Erkrankung ausgesetzt (Morgan et al. 2015). Die Säulen der momentanen EMS-Behandlung stellen Futterrestriktion und vermehrte Bewegung dar – allerdings ist hierfür die Compliance des Besitzers sehr wichtig und auch die momentane Verfassung des Pferdes (Morgan et al. 2016).

Die Supplementierung von Magnesium wurde bereits durchgeführt und brachte widersprüchliche Ergebnisse, wobei teils keine Verbesserung der Insulinsensitivität bewirkt werden konnte (Chameroy et al. 2011) und teils eine Tendenz zu erkennen war (Winter et al. 2016). Magnesium ist ein solch wichtiges Kation, das in viele Stoffwechselfvorgänge involviert ist (Chaudhary et al. 2010). Es zeigt in der Humanmedizin einen positiven Effekt auf die Insulinsensitivität (Kurth 2012). Beim Menschen mit Diabetes Mellitus Typ II liegt häufig ein Magnesiummangel auf intrazellulärer Ebene vor (Barbagallo und Dominguez 2007, 2015).

Beim Pferd hingegen wurden erst wenige intrazelluläre Magnesiummessungen durchgeführt. Eine Studie von Winter et al. zeigt, dass Pferde mit EMS einen signifikant niedrigeren intrazellulären Magnesiumgehalt aufweisen als gesunde Pferde (Winter et al. 2020).

Dies wurde als Ansatz für diese Studie genommen und ein bereits in der Futtermittelindustrie etabliertes Präparat, das Magnesiumaspartat-Hydrochlorid enthält, im Hinblick auf die Verbesserung der Insulinsensitivität getestet. Dieses könnte die Insulinresistenz bei Pferden mit EMS bzw. die Glukose-Metabolisierung verbessern.

3. Material und Methoden

3.1. In-vivo-Studie an EMS-Patienten

3.1.1. Studienpopulation

3.1.1.1. Studiendesign

Bei der hier durchgeführten Studie in der Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin handelt es sich um eine randomisierte, prospektive Interventionsstudie. Weder die Studienteilnehmer noch die Untersucher wissen, welches Pferd der Placebo- bzw. Verum-Gruppe zugeordnet wurde.

3.1.1.2. Fallzahl

Die Probensammlung wurde zwischen August 2016 und März 2018 durchgeführt. Die Blutproben wurden im Rahmen einer routinemäßigen tierärztlichen Untersuchung an Patienten der Klinik für Pferde entnommen. Insgesamt wurden 51 Pferde, die phänotypische Merkmale für das Equine metabolische Syndrom aufwiesen, in diesem Zeitraum auf EMS getestet. Eigneten sich die Patienten und erfüllten diese die Kriterien für die Teilnahme an der Studie, wurde eine schriftliche Einverständniserklärung von allen Pferdebesitzern eingeholt. Da es keine derzeitige zugelassene Behandlungsmöglichkeit für EMS gibt, wollten die Besitzer, dass ihre Pferde an der Studie teilnehmen.

3.1.1.3. Einschlusskriterien

41 Studienteilnehmer waren im Rahmen der klinischen Diagnostik positiv auf EMS mittels cGIT getestet worden. Als positiv galten die Pferde, deren Glukosekurve verlängert war d.h. wenn ≥ 75 Minuten benötigt wurden, um nach Stimulation den basalen Glukosewert wieder zu erreichen. Außerdem mussten die Pferde phänotypische Merkmale von EMS zeigen, mit einem BCS von ≥ 6 (Henneke et al. 1983) und einem CNS von ≥ 3 (Carter et al. 2009).

3.1.1.4. Ausschlusskriterien

Ausgeschlossen wurden die Pferde, die negativ auf das Equine metabolische Syndrom getestet wurden. Außerdem durften Pferde mit bestimmten Problemen wie – akute Hufrehe,

akute und chronische Schmerzen unabhängig von der Ursache – an der Studie nicht teilnehmen.

3.1.2. Studienablauf

Die möglichen Teilnehmer der Studie waren zumeist ca. 24 Stunden vor Durchführung des cGITs stationär in der Klinik für Pferde untergebracht. Die Pferde wurden in einer Box mit Späne-Einstreu aufgestallt.

Im Rahmen der Erstuntersuchung wurde vor Testbeginn eine klinische Untersuchung durch die Doktorandin oder eine Mitarbeiterin der Abteilung für Innere Medizin vorgenommen. Das Allgemeinbefinden wurde beurteilt, die Pferde gewogen und die Körpergröße gemessen. Zudem wurden Informationen vom Tierhalter bezüglich der Krankengeschichte, Haltung und Nutzung gesammelt. Die phänotypischen EMS-Merkmale wurden beurteilt und nach den Skalen des BCS und CNS eingestuft.

Des Weiteren mussten sich die Pferde einer orthopädischen Funktionskontrolle nach OBEL unterziehen (Meier et al. 2019). Die Definition der 5 Obel Grade sind in Tabelle 5 beschrieben.

Tabelle 5: Obel Score zur Beurteilung einer Lahmheit; Grad 0 – 4 (Meier et al. 2019).

Laminitis Grade	Beschreibung des Grades
Normal	Das Pferd scheint gesund zu sein.
Obel Grad 1	Im Stand verlagert das Pferd das Gewicht zwischen den beiden Vordergliedmaßen hin und her; Das Pferd ist lahmfrei im Schritt, aber das Gangbild ist im Trab auf der Geraden und auf dem Zirkel gestelzt/klamm.
Obel Grad 2	Das Gangbild ist gestelzt/klamm im Schritt; Das Pferd zeigt Probleme in der Wendung (Wendeschmerz); Die Vordergliedmaßen sind aufhebbar.
Obel Grad 3	Das Pferd bewegt sich nur widerwillig im Schritt; Die Vordergliedmaßen sind nur sehr schwer aufhebbar.
Obel Grad 4	Das Pferd bewegt sich nur, wenn es dazu gezwungen wird.

Es wurde das Gangbild im Schritt und Trab auf der Geraden auf hartem Boden, sowie in einer Schrittvolute beurteilt. Außerdem wurde eine Hufzangenprobe durchgeführt (Knowles et al. 2012).

Nach einer Hungerperiode von 6 Stunden wurden basale Blutwerte über einen zuvor unter sterilen Kautelen in die V. Jugularis gelegten Katheter bestimmt und ein kombinierter Glukose-Insulin-Toleranztest, wie im Kapitel „Blutentnahme und Parameter“ beschrieben, durchgeführt.

Waren alle Einschlusskriterien erfüllt, wurden die Pferde nach einem Zufallsschema (siehe Anhang) der Gruppe A bzw. Gruppe B zugeteilt. Eine dieser Gruppen war die Verum-, die andere war die Placebo-Gruppe.

Für die Einteilung bekam jedes Pferd eine Pferde-Fallnummer, die in aufsteigender Zahlenfolge angegeben wurde. Die erste Pferde-Fallnummer des ersten in die Studie eingeschlossenen Pferdes war die Nummer 101. Die Kanister mit dem Verum- oder Placebo-Inhalt waren mit den entsprechenden Fallnummern beschriftet. Die Entscheidung, ob das Pferd in Gruppe A bzw. Gruppe B, somit in die Verum- oder Placebo-Gruppe eingeteilt wurde, war nur dem Hersteller und Lieferanten der Studienpräparate bekannt. Somit lief die Studie doppelt verblindet ab.

Die Pferde bekamen über einen Zeitraum von 3 Monaten 1x täglich 0,46 ml/kg KGW von dem Präparat bzw. 30 mg/kg KGW Magnesiumaspartat-Hydrochlorid oral eingegeben. Nach den 3 Monaten wurden die Pferde erneut in der Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin zur Abschlussuntersuchung (Nachuntersuchung) durch die Doktorandin bzw. eine Mitarbeiterin der Abteilung Innere Medizin und zur erneuten basalen Blutwert-Bestimmung, sowie Durchführung des cGITs vorgestellt. Nach der statistischen Auswertung erfolgte die Entblindung der Studie.

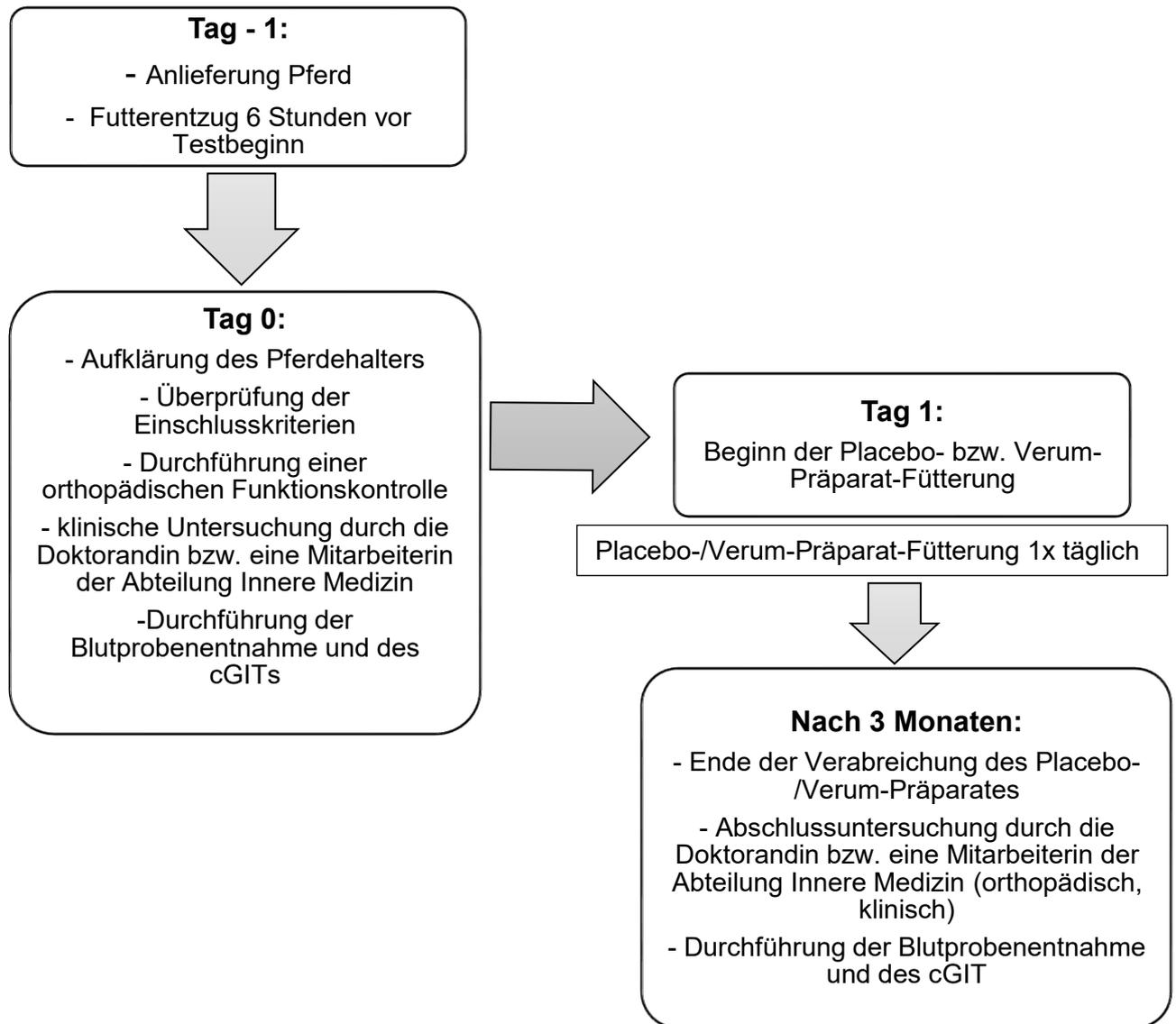


Abbildung 4: Studienablauf (Tag – 1 bis 3 Monate).

3.1.3. Zusammensetzung Verum- und Placebo-Präparat

Bei dem Ergänzungsfuttermittel handelte es sich um ein von Verla-Pharm (Hauptstrasse 98, D-82327 Tutzing) hergestelltes und zur Verfügung gestelltes Verum- bzw. Placebo-Präparat. Das Ergänzungsfuttermittel wurde in Kanistern ausgehändigt und mit einer Fallnummer versehen, die den jeweiligen Pferden zugeordnet wurde.

Bei dem Verum-Präparat handelte es sich um eine magnesiumhaltige Lösung – das Produkt Nupafeed® horse liquid. Ein ml der Lösung enthält Magnesiumaspartat-Hydrochlorid (entsprechend 64,5 mg Magnesium) als wirksame Komponente, 1,3 mg Kaliumsorbit und Wasser. Der Kanister wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Bei dem Placebo-Präparat handelte es sich um eine kaliumsorbothaltige Lösung ohne jegliche ernährungsphysiologische Komponente. Ein ml der Lösung enthält 1,3 mg Kaliumsorbat und Wasser. Der Kanister wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Ob es sich bei dem Inhalt des Kanisters um den des Verums bzw. Placebos handelte, wusste zum Zeitpunkt der Studiendurchführung nur der Hersteller des Präparates.

3.1.4. Experimenteller Aufbau

3.1.4.1. Blutentnahme und Parameter

Die Blutentnahme fand nach einem standardisierten Protokoll (Eiler et al. 2005) statt unter strengen zeitlichen Vorgaben. Bevor die basalen Blutproben genommen und der cGIT gestartet wurde, wurde den Pferden für 6 Stunden das Futter entzogen. Wasser stand den Pferden die gesamte Zeit zur Verfügung. Zur Blutprobenentnahme und für den cGIT bekamen die Pferde einen Kurzzeitkatheter (Braunüle MT®, Braun, Sempach/Schweiz) in die rechte oder linke V. Jugularis gelegt. Hierzu wurde das Haarkleid mit einer Schermaschine geschoren und der Bereich der Einstichstelle mit Braunol und Alkohol antiseptisch vorbereitet. Unter einer kleinen Lokalanästhesie mit ca. 3 ml Scandicain (Scandicain® 2 %, Astra Zeneca GmbH, Wedel/Deutschland) wurde die Region der Einstichstelle schmerzunempfindlich gemacht und der Kurzzeitkatheter unter antiseptischen Kautelen gelegt. Dieser wurde mittels Nahtmaterial (0 Prolene - monofiles chirurgisches Nahtmaterial nicht resorbierbar, Ethicon, Norderstedt/Deutschland) in Position fixiert. Alle gesammelten Blutproben wurden unter vorherigem Verwerfen einer 10 ml Spritze Blut entnommen. Nach jeder Entnahme oder Applikation wurde der Kurzzeitkatheter mittels Natrium-Chlorid-Lösung (isotonische Natriumchlorid-Lösung ad us. Vet., B. Braun Vet., Melsungen/Deutschland) unter Zusatz von 50 I.E. Heparin (Heparin-Natrium "Multi" 10000 I.E./ml, B. Braun, Melsungen/Deutschland) pro ml NaCl gespült. Zum Zeitpunkt 0 wurden insgesamt drei Serumröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht/Deutschland) mit Blut befüllt. Diese wurden, nachdem die Röhrchen eine halbe Stunde stehen gelassen wurden, 10 Minuten bei 4000 *g* zentrifugiert (Rotofix 32 A, Hettich, Tuttlingen/Deutschland). Aus dem hieraus entstandenen Serum wurden totales Magnesium, Fruktosamin, Insulin, Triglyzeride (TG), Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) bestimmt. Fruktosamin, Magnesium und Insulin wurden im Fremdlabor (Laboklin, Bad Kissingen/Deutschland) gemessen. Die Referenzbereiche wurden vom Referenzlabor festgelegt. Lag der Fruktosamin-Gehalt <350 µmol/l war dieser im Normalbereich. Der Referenzbereich für den basalen Magnesiumgehalt wurde im Blutserum mit 0,5-0,9 mmol/l festgelegt. Lag der basale Insulinwert >20 µU/ml, war dieser erhöht.

TG und GGT konnten im Labor der Klinik für Pferde mittels Reflotron (Reflotron Plus, Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen/Deutschland) bestimmt werden. Für die Triglyzeride wurde ein Normwert von <70 mg/dl festgelegt und für die GGT ein Normwert von <20 U/l. Diese Werte wurden betrachtet, um festzustellen, ob eine vermehrte Fetteinlagerung den Leberstoffwechsel beeinflusst.

Des Weiteren wurde zum Zeitpunkt 0 ein EDTA-Blut-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht/Deutschland) mit Blut des Patienten befüllt. Dieses wurde bei 3000 *g* für 10 Minuten zentrifugiert. Das so entstandene EDTA-Plasma wurde anschließend abpipettiert und zur Adrenocorticotropes-Hormon-(ACTH)-Bestimmung an das Fremdlabor Laboklin geschickt. Der ACTH-Wert ist bei Pferden mit „Pituary Pars Intermedia Dysfunction“ (PPID) signifikant erhöht (Walsh et al. 2009, McFarlane 2011). Bis zum Versand wurde das EDTA-Plasma im Kühlschrank kühl gelagert. Der Referenzbereich wurde vom Fremdlabor Laboklin festgelegt. In den Monaten August bis Oktober sollten die Werte <47 pg/ml und in den Monaten November bis Juli <29 pg/ml betragen.

Außerdem wurde eine Blutgasspritze (BD A-Line, Becton Dickinson AG, Basel/Schweiz) zur Nüchtern-Glukosebestimmung (Basalwert) entnommen. Dieser Wert wurde im Labor der Klinik für Pferde (Cobas b 123, Roche, Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen/Deutschland) ermittelt. Des Weiteren wurden zwei Lithium-Heparin-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht/Deutschland) mit Blut befüllt. Hieraus wurden im Labor des Institutes der Veterinär-Physiologie der Freien Universität Berlin (Oertzenweg 19 b, Gebäude 11, 14163 Berlin) Leukozyten isoliert und eine Bestimmung der freien intrazellulären Magnesiumkonzentration durchgeführt.

Die Nüchternglukose-Konzentration liegt in der Norm, wenn diese ≤ 100 mg/dl beträgt. Folglich liegt eine Hyperglykämie vor, wenn die ermittelte Konzentration > 100 mg/dl beträgt.

Sobald die Nullproben genommen waren, wurde der cGIT gestartet. Hierzu wurden nacheinander 150 mg/kg KGW Glukose (Glukoselösung 40 % ad us. Vet., B. Braun Vet., Melsungen/Deutschland) und anschließend 0,1 IE/kg KGW Insulin (Caninsulin® 40 IE/ml, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim/Deutschland) verdünnt mit Kochsalzlösung (isotonische Natriumchlorid-Lösung ad us. Vet., B. Braun Vet., Melsungen/Deutschland) intravenös verabreicht und nach den definierten Zeitpunkten 1, 5, 15, 25, 35, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150 (Minuten) Blutgasproben entnommen und die Blutglukose bestimmt (Eiler et al. 2005). Aus diesen Werten ergab sich eine Glukosekurve, anhand derer die Zeit bis zum Wiedererreichen des Glukosebasalwertes und damit eine Einschätzung und Bewertung des Testes mit positiv oder negativ vorgenommen werden konnte.

Nach 45 Minuten wurde zusätzlich zur Blutgasprobenentnahme ein Serumröhrchen befüllt und im Labor der Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert und zur Ermittlung des stimulierten Serum-Insulin-Wertes an das Fremdlabor Laboklin versandt. Eine Erhöhung des stimulierten Insulins lag bei $>100 \mu\text{U/ml}$ vor. Im Rahmen des dynamischen Tests (cGIT) bewirkt die Insulininjektion einen ungefähr 228-fachen Anstieg in der Insulin-Konzentration nach einer Minute. Nach ca. 45 Minuten sollte der Insulin-Basalwert wieder erreicht sein (Eiler et al. 2005). Ist dies nicht der Fall spricht man von einer Insulinresistenz und einer vorliegenden Hyperinsulinämie.

Außerdem wurden nach 45 Minuten zwei Lithium-Heparin-Röhrchen mit Blut befüllt und eine weitere Leukozytenisolation und intrazelluläre freie Magnesium-Bestimmung im Labor des Institutes für Veterinär-Physiologie der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Nach Beendigung des Testes wurden die Pferde umgehend angefüttert, um eine Hypoglykämie zu vermeiden. Der Katheter wurde anschließend gezogen. Die durchgeführten Untersuchungen wurden nach dem 3-monatigen Applikationszeitraum des Verum- bzw. Placebo-Präparates wiederholt.

Der kombinierte Glukose-Insulin-Toleranztest wurde sowohl bei der Vor- als auch Nachuntersuchung an allen Studienteilnehmern durchgeführt. Aufgrund dessen, dass in dieser Studie Caninsulin 40IE (65 % kristallines und 35 % amorphes Zink-Insulin vom Schwein) anstelle des für den Test empfohlene humane Insulin für den cGIT verwendet wurde, wurde der cGIT als positiv gewertet, wenn die Glukose nach 75 Minuten nicht den Basalglukose-Wert erreicht hatte.

Die letzte Blutprobe wurde nach 150 Minuten genommen. Wurde hier die Baseline noch nicht erreicht, wurde für die statistische Auswertung der Wert 200 angenommen.

3.1.4.2. Ermittlung der Proxies RISQI und MIRG

Aus den ermittelten Blutparametern wurden die Proxies RISQI und MIRG errechnet (Treiber et al. 2005, Treiber et al. 2006).

RISQI (=reciprocal inverse square of insulin) ist ein errechneter Wert, der ein Maß für die Insulinsensitivität darstellt. Man teilt die Ergebnisse folgendermaßen ein:

Ein Ergebnis $>0,32$ spricht für eine ungestörte Insulinsensitivität, ein Wert zwischen $0,32-0,22$ definiert eine kompensierte Insulinresistenz und ein Ergebnis $<0,22$ entspricht einer hochgradigen nicht-kompensierten Insulinresistenz.

Die Formel zur Errechnung des RISQI lautet:

$$\text{RISQI} = 1 / \sqrt{\text{basalesInsulin}}$$

MIRG (=modified insulin-to-glucose ratio) ist ein Wert, der die Antwort der beta-Zellen des Pankreas auf Glukose beschreibt und somit die Insulinsekretion widerspiegelt. Errechnet wird der Wert folgendermaßen:

$$\text{MIRG} = [800 - 0.3 \times (\text{basalesInsulin} - 50)^2] / (\text{basaleGlukose} - 30)$$

MIRG-Werte >5,6 zeigen eine kompensatorische Erhöhung der Insulin-Werte an.

3.1.4.3. Intrazelluläre Magnesiummessung

Die Zellisolation (Delva et al. 1996, Winter et al. 2018) wurde nach einem strengen Protokoll durchgeführt. Die intrazelluläre Magnesiummessung wurde, unmittelbar nach der Blutentnahme im Stall der Klinik für Pferde, im Labor des Institutes der Veterinär-Physiologie an der Freien Universität Berlin durchgeführt. Hierzu wurden zunächst die Leukozyten isoliert. Die intrazelluläre Magnesiummessung und Zellaufbereitung wurde bereits von Delva et al. beschrieben und durchgeführt (Delva et al. 1996, Winter et al. 2018). Aus den 2 Lithium-Heparin-Röhrchen wurde 8 ml Blut abpipettiert und mit 8 ml PBS (Phosphate buffered saline, Lonza, Basel/Schweiz), welches mit 0,8 mmol/l Magnesiumchlorid (MgCl_2) versetzt wurde, gemischt.

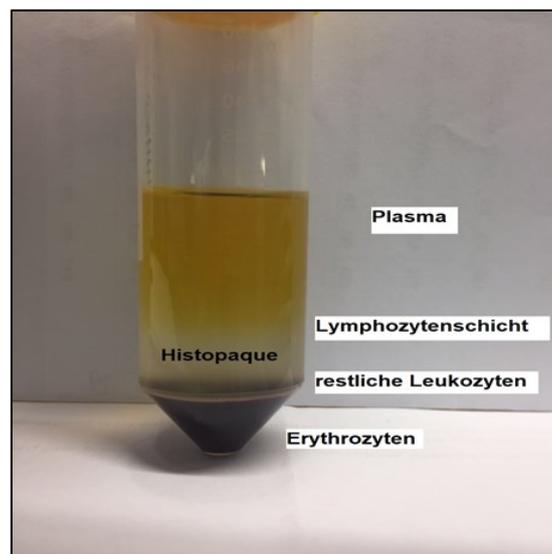


Abbildung 5: Zentrifugierte Probe vor der Lymphozytenextraktion. Nach der Zentrifugation befinden sich die Erythrozyten ganz unten. Das Histopaque trennt die Lymphozyten/Leukozyten vom Plasma und den Erythrozyten.



Abbildung 6: Lymphozyten.
Die weißen kleinen "Flocken" sind die abpipettierenden Lymphozyten.

Nach vorsichtigem Schwenken wurde dieses Gemisch über 10 ml Histopaque (Histopaque®-1077, Sigma Aldrich, Taufkirche/Deutschland) geschichtet und in der Zentrifuge (Eppendorf Zentrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg/Deutschland) mit Ausschwingrotor bei 21°C, 700 *g* für 20 Minuten zentrifugiert. Aus der zentrifugierten Probe wurde die Lymphozytenschicht abpipettiert. Das Histopaque-1077 ist zur Isolation einer großen Menge an lebensfähigen Lymphozyten geeignet. Die abpipettierten Lymphozyten wurden mit Hanks' Salz-Lösung (HBSS, Biochrom GmbH, Berlin/Deutschland), die mit 0,8 mmol/l MgCl₂ versetzt war, in drei Schritten gewaschen. Hierzu wurde erneut die Zentrifuge mit Ausschwingrotor genutzt und je Waschschrift bei 21°C, 550 *g* 7 Minuten zentrifugiert. Hiernach wurde der Überstand verworfen. Das finale Pellet wurde mit 1 ml HBSS(+MgCl₂) versetzt und in ein Eppendorfröhrchen gefüllt.

Aus dieser Probe wurde nun die Zellzahl in einem automatischen Zellzähler (Automated Cell Counter, TC20, BioRad, München/Deutschland) bestimmt. Hierzu wurden 10 Mikroliter (µl) der Probe mit 10 µl Trypanblau (TrypanBlueDye, BioRad, München/Deutschland) versetzt, auf ein Messslide (Counting Slides – dual chamber, BioRad, München/Deutschland) gegeben und mittels Probengerät ausgewertet (Automated Cell Counter, TC20, BioRad, München/Deutschland). Dieses ermittelt die Gesamtzellzahl, die lebenden Zellen und die lebenden Zellen in Prozent.

Der Rest der Probe wurde mit 8,7 µl MagFura 2 (Thermo Fischer Scientific, Dreieich/Deutschland) geladen. Hierzu wurde die Probe für 30 Minuten bei 37°C auf der

Rüttelplatte (Eppendorf Thermomixer Compact, Eppendorf AG, Hamburg/Deutschland) inkubiert – hier musste unbedingt darauf geachtet werden, dass die Proben abgedeckt waren, d.h. lichtgeschützt, da das MagFura 2 lichtempfindlich ist. Anschließend wurde die Probe für 5 Minuten bei 400 *g* zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5418, Eppendorf AG, Hamburg/Deutschland). Der Überstand wurde danach verworfen und die Probe mit 1 ml HBSS (+MgCl₂) wieder aufgefüllt. Diese Probe wurde erneut auf der Rüttelplatte inkubiert, diesmal allerdings nur für 20 Minuten bei 37°C. Anschließend wurde die Probe nochmals bei 400 *g* für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Probe mit 1ml HBSS (+MgCl₂) wieder aufgefüllt.

Das MagFura 2 ist in der Lage die Zellmembran zu passieren, wird innerhalb der Zelle durch Esterasen hydrolysiert und ist somit in der Zelle gefangen.

Die Magnesiummessung wurde mittels Spektrofluorometer (Fluorescence Spectrometer LS55, PekinElmer, Rodgau/Deutschland) im Fastfilter gemessen.

Die mit MagFura 2 beladenen Zellen wurden gemeinsam mit dem HBSS(+MgCl₂) in die Küvette des Messgerätes gegeben, dazu wurde ein weiterer ml HBSS (+MgCl₂) hinzugegeben. MagFura bindet innerhalb der Zelle das freie Magnesium, sodass sich die Exzitationswellenlänge verändert. Es gibt ein festgelegtes Exzitationsmaximum für MagFura 2. Dieses verschiebt sich mit der Entstehung vermehrter MagFura 2-Magnesium-Komplexe. Diese Werte liegen bei 340 nm und 380 nm. Die Ergebnisse ergeben sich aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensität bei den Exzitationsmaxima/-minima 340 nm und 380 nm.

Das initiale Fluoreszenzverhältnis inkludiert auch die Fluoreszenzsignale, die aufgrund von extrazellulären Komplexen von MagFura 2 mit extrazellulärem Calcium und Magnesium entstehen. Deshalb wurde der Probe EDTA und EGTA hinzugegeben, um diese extrazellulären Komplexe wegzufangen. Das Fluoreszenzverhältnis nach der Zugabe des EDTA/EGTAs repräsentierte somit die intrazelluläre Magnesiumkonzentration. Anschließend wurde der Suspension zur Lyse der Zelle Triton X-100 zugegeben. Das noch vorhandene EDTA/EGTA geht nun Komplexe mit dem intrazellulären Magnesium ein. Dieses Fluoreszenzverhältnis zeigt nun das minimale Fluoreszenzminimum. Die Zugabe von 100 mmol/l Magnesiumchlorid diente als nächster Schritt dazu, die maximale Fluoreszenzauflösung zu ermitteln.

Die intrazellulären Magnesiumwerte wurden mittels der Formel nach Gryniewicz et al. (1985) berechnet (Kurth 2012, Winter et al. 2018).

$$[Mg^{2+}]_i = K_d \times \left[\frac{(R-R_{Min})}{(R_{Max}-R)} \right] \times \left(\frac{S_f}{S_b} \right)$$

$[Mg^{2+}]_i$	Freies intrazelluläres Magnesium
K_d	Dissoziationskonstante von MagFura 2 / Mg^{2+} Komplexen
R_{Min}	Exzitations- oder Emissions-Ratio bei minimaler intrazellulärer Magnesiumkonzentration
R_{Max}	Exzitations- oder Emissions-Ratio bei maximaler intrazellulärer Magnesiumkonzentration
S_f	Maximale Fluoreszenzintensität für die Wellenlänge R_{Min}
S_b	Maximale Fluoreszenzintensität für die Wellenlänge R_{Max}

Abbildung 7: Gleichung zur Berechnung der Ionenkonzentration mittels Spektrofluorometer (Grynkiewicz et al. 1985).

3.2. Auswertungen

Nach der Gewinnung der Daten und Abschluss der praktischen Arbeit erfolgte die Eintragung der Daten zur übersichtlichen Bearbeitung in das Programm Microsoft® Excel 2016, Microsoft Corporation, Redmond, USA. Für die Auswertung und Berechnungen wurde das Computerstatistikprogramm IBM®- SPSS Inc., Chicago Illinois, USA, Version 25.0 verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von PD Dr. med. vet. Roswitha Merle, Dipl. ECVPH aus dem Institut für Veterinär-Epidemiologie und Biometrie der Freien Universität Berlin.

Die erhobenen Daten vor und nach Verabreichung des Verum- oder Placebo-Präparates wurden mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests/Shapiro-Wilk-Tests und der visuellen Einschätzung mittels Histogramms und QQ-plots auf Normalverteilung geprüft. Im weiteren Verlauf wurden die normalverteilten Daten mittels parametrischer Tests und die nicht-normalverteilten Daten mittels nicht-parametrischen Tests ausgewertet. Die statistische Auswertung war prospektiv.

Für die normalverteilten Daten wurden Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum, sowie das Konfidenzintervall angegeben. Für nicht-normalverteilte Daten wurden der Median und die Interquartilrange (IQR) angegeben.

Mittels linearer Regression wurde für die normalverteilten Daten untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der intrazellulären Magnesiumkonzentration und den einzelnen erhobenen Parametern besteht. Dies wurde für die gesamte Studienpopulation und für die einzelnen Gruppen durchgeführt.

Ob es signifikante Unterschiede zwischen vor und nach der Verum- bzw. Placebo-Applikation (*Differenz_{vorher-nachher}*) gibt, wurde mittels One-Sample Wilcoxon Signed Rank Test einmal für alle Daten und einmal getrennt für jede Gruppe bestimmt.

Als Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1. Studienpopulation

In diese Studie wurden 41 an EMS leidende Tiere aufgenommen – 26 Stuten und 15 Wallache. Die Tiere hatten eine Körpergröße von 80 cm – 174 cm. Der Median des Body Condition Score lag bei 8/9 (IQR 2) und der Median des Cresty Neck Score lag bei 4/5 (IQR 1). Die gesamte Studienpopulation wog durchschnittlich $431 \text{ kg} \pm 140 \text{ kg}$. 10 Pferde wurden negativ auf das Equine metabolische Syndrom getestet, sodass diese nicht in die Studie aufgenommen wurden.

Am 16.04.2018 wurde durch Verla-Pharm die Entblindung vorgenommen. Diese zeigte, dass Gruppe A die Placebo-Gruppe und Gruppe B die Verum-Gruppe war. Von den untersuchten Tieren waren 22 Tiere (54%) in der Gruppe A und 19 (46%) in der Gruppe B. Insgesamt waren 4 Pferde bei der Nachuntersuchung nicht berücksichtigt worden. Bei einem Pferd aus Gruppe A (Pferde-Fallnummer 101) konnte aufgrund von laboratorischen Problemen keine intrazelluläre Magnesiummessung durchgeführt werden. Alle anderen erhobenen Parameter wurden in die statistische Auswertung mit einbezogen. Weitere 3 Pferde aus Gruppe B (Pferde-Fallnummer 110, 124, 138) waren nicht zur Nachkontrolle erschienen – alle aufgrund von Nichtakzeptanz des Präparates. Hier konnten demzufolge keine Parameter in die statistische Auswertung mit einbezogen werden.

4.2. Blutentnahme und Zellisolation

4.2.1. Parameter des cGITs und der Insulinsensitivität

4.2.1.1. Glukose

Der Mittelwert der Nüchternglukose lag im Rahmen der Voruntersuchung bei $93,24 \text{ mg/dl} \pm 10,03 \text{ mg/dl}$. Bei 24% (10/41) der beprobten Pferde lagen sehr leicht erhöhte/grenzwertige Glukosewerte im nüchternen Zustand vor. Im Rahmen der Nachuntersuchung lag der Mittelwert der Nüchternglukose bei $91,45 \text{ mg/dl} \pm 9,6 \text{ mg/dl}$. Hier wiesen 21,05% (8/38) Pferde eine sehr leichte/grenzwertige Erhöhung der Glukosewerte auf. Ein signifikanter Unterschied zwischen "Vorher und Nachher" für die gesamte Fallzahl, sowie für die Placebo- und Verum-Gruppe konnte nicht festgestellt werden. In Tabelle 6 sind der Mittelwert (\bar{x} mg/dl), die Standardabweichung (mg/dl), Min./Max. (mg/dl), das Konfidenzintervall (mg/dl) sowie der Median der Differenz für die gesamte Studienpopulation, aber auch für die einzelnen Gruppen

A und B vor und nach der Verum-/Placebo-Gabe aufgeführt. Mittels T-Test bei unabhängigen Stichproben konnte gezeigt werden, dass sich die Nüchtern glukose-Konzentration nach dem 3-monatigen Applikationszeitraum voneinander signifikant ($p=0,029$) zwischen den Gruppen unterschieden. Die Nüchtern glukose-Konzentration lag in der Placebo-Gruppe mit $88,95 \text{ mg/dl} \pm 9,09 \text{ mg/dl}$ unter der Nüchtern glukose-Konzentration der Verum-Gruppe mit $95,38 \text{ mg/dl} \pm 9,11 \text{ mg/dl}$. Der Unterschied lag mit 95%iger Wahrscheinlichkeit zwischen $0,72 \text{ mg/dl} - 12,87 \text{ mg/dl}$.

Tabelle 6: Nüchtern glukose (mg/dl).

Glukose ZP 0 (mg/dl)	MW / SD		Min / Max		95% Konfidenzintervall Obere/untere Grenze		Differenz (Median/IQR)
	vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher	
Gesamt	93,24/10,03	91,45/9,59	76/116	75/113	90,08/96,41	88,29/94,6	2,5/11
Placebo-Gruppe	90,73/7,33	88,95/9,09	77/108	75/113	87,48/93,98	84,56/92,62	2/12
Verum-Gruppe	96,16/12,01	95,38/9,11	76/116	79/112	90,37/101,95	90,52/100,23	4/13

4.2.1.2. Ergebnisse cGIT

Ein positiver cGIT war Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie - daher wurden bei der Erstuntersuchung alle Studienteilnehmer d.h. $n=41$ einbezogen. In Tabelle 7 sind der Mittelwert (ZP in Minuten), die Standardabweichung (ZP in Minuten), Min. und Max., das Konfidenzintervall sowohl für die gesamte Fallzahl als auch für die einzelnen Gruppen aufgeführt. Außerdem wurden der Median und die IQR der Differenz Vorher-/Nachher-Werte ermittelt. Abbildung 8 veranschaulicht, dass in Gruppe B die Ergebnisse des cGITs im direkten Vergleich ("Vorher/Nachher") ähnlich blieben.

Tabelle 7: Ergebnisse cGIT (ZP in Minuten).

cGIT ZP in Minuten	MW / SD		Min / Max		95% Konfidenzintervall Obere/untere Grenze		Differenz (Median/IQR)
	vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher	
Gesamt	138,17/42,67	118,42/58,89	75/200	15/200	124,7/151,64	99,07/137,78	22,5/85
Placebo-Gruppe	154,09/42,97	121,59/68,39	75/200	15/200	135,04/173,14	91,27/151,91	37,5/76
Verum-Gruppe	119,74/34,98	114,06/44,39	75/200	45/200	102,88/136,60	90,41/137,72	7,5/83

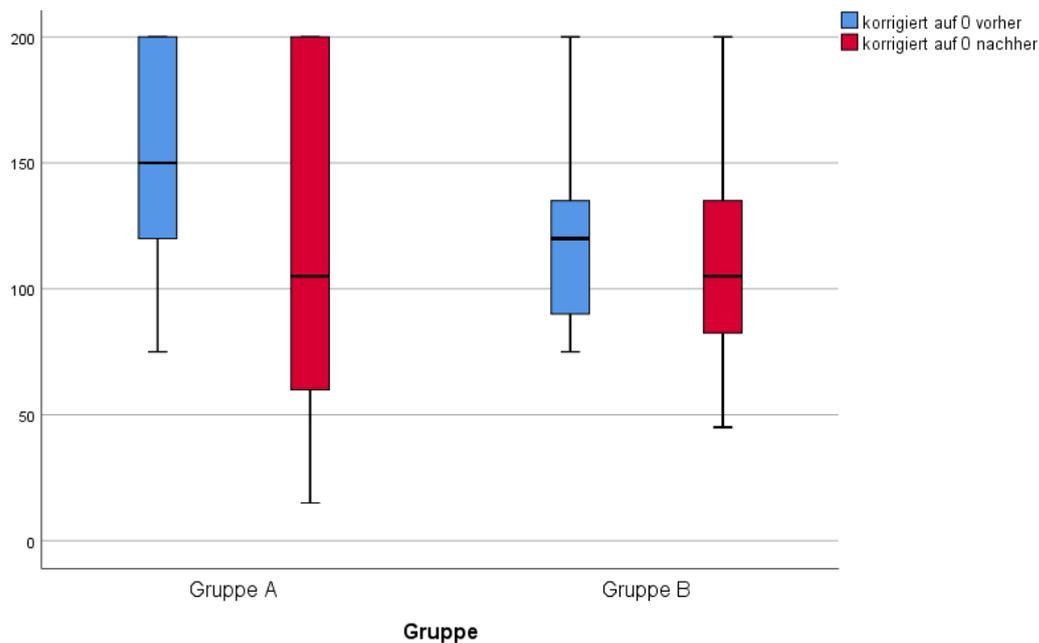


Abbildung 8: Vergleich des cGITs vorher/nachher zwischen den Gruppen A & B.

Die Ergebnisse des „One Sample Wilcoxon Signed Rank Test“ zeigten in der Placebo-Gruppe eine signifikante ($p=0,045$) Verringerung der Werte. Die Werte waren im Rahmen der Nachuntersuchung im Mittel um 38 Minuten niedriger. Insgesamt fielen in der Nachuntersuchung 21% (8/38) der Ergebnisse negativ aus. Hiervon waren 6 Pferde in der Placebo-Gruppe und 2 Pferde in der Verum-Gruppe.

4.2.1.3. Insulin

4.2.1.3.1. Nüchterninsulin

Es konnte weder vor noch nach der 3-monatigen Verabreichung des Placebo-/Verum-Präparates eine basale Hyperinsulinämie oder ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten festgestellt werden.

Der Mittelwert lag vor der Verabreichung bei $7,35 \mu\text{U/ml} \pm 4,2 \mu\text{U/ml}$ und nach der Verabreichung bei $7,31 \mu\text{U/ml} \pm 4,7 \mu\text{U/ml}$.

In Tabelle 8 sind der Mittelwert der Nüchterninsulin-Konzentration (\bar{x} $\mu\text{U/ml}$), die Standardabweichung, Min. und Max., das Konfidenzintervall sowie der Median der Differenz ($Differenz_{\text{vorher-nachher}}$) übersichtlich aufgeführt.

Tabelle 8: Nüchterninsulin ($\mu\text{U/ml}$).

Insulin ZP 0 ($\mu\text{U/ml}$)	MW / SD		Min / Max		95% Konfidenzintervall Obere/untere Grenze		Differenz (Median/IQR)
	vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher	
Gesamt	7,35/4,2	7,31/4,7	0,9/18	1,8/24,9	6,02/8,67	5,76/8,85	0,45/3,1
Placebo-Gruppe	8,28/4,6	7,92/5,64	1,93/18	1,8/24,9	6,24/10,32	5,42/10,42	0,6/3,35
Verum-Gruppe	6,26/3,49	6,46/2,96	0,9/14,8	2,8/11,3	4,58/7,94	4,88/8,03	0,1/3,18

Mittels T-Test für unabhängige Stichproben wurde kein signifikanter Unterschied der Nachher-Werte zwischen den Gruppen festgestellt. Außerdem wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Vorher- und Nachher-Werten mittels „One Sample Wilcoxon Signed Rank Test“ ermittelt.

4.2.1.3.2. Stimuliertes Insulin nach 45 Minuten

Tabelle 9: Stimuliertes Insulin nach 45 Minuten ($\mu\text{U/ml}$).

Insulin ZP 45 ($\mu\text{U/ml}$)	MW / SD		Min / Max		95% Konfidenzintervall Obere/untere Grenze		Differenz (Median/IQR)
	vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher	
Gesamt	70,48/42,32 n(7) > 100	55,97/39,74 n(4) > 100	19,2/211,5	15,8/234,4	57,13/83,84	42,72/69,22	12,6/32,6
Placebo-Gruppe	85,37/45,34 n(5) > 100	62,22/48,64 n(4) > 100	25,1/211,5	16,52/234,4	65,27/105,47	40,08/84,36	20,5/43,2
Verum-Gruppe	53,25/31,58 n(2) > 100	47,77/22,55 n(0) > 100	19,2/135,2	15,8/94,1	38,03/68,47	35,75/59,79	5,3/27,38

Der Mittelwert, die Standardabweichung, Min. und Max. und das Konfidenzintervall des stimulierten Insulins zum Zeitpunkt 45 bei der Erst- und Nachuntersuchung sind in Tabelle 9 aufgeführt. Diese Werte sind einmal für die gesamte Studienpopulation und einmal für die jeweilige Gruppe aufgeführt. Der Gesamt-Mittelwert lag im Rahmen der Erstuntersuchung bei $68,57 \mu\text{U/ml} \pm 37,86 \mu\text{U/ml}$, im Rahmen der Nachuntersuchung bei $55,97 \mu\text{U/ml} \pm 39,74 \mu\text{U/ml}$. Des Weiteren beschreibt „n“ in der Tabelle die Anzahl der Tiere mit einer Hyperinsulinämie nach 45 Minuten. 17% (7/41) der Pferde zeigten eine Hyperinsulinämie bei der

Erstuntersuchung. Nach dem Applikationszeitraum zeigten noch 10,81% (4/37) eine Hyperinsulinämie.

In Abbildung 9 sind im direkten Vergleich die stimulierten Insulinwerte vor und nach der Placebo-/Verum-Applikation zwischen den Gruppen dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass die stimulierte Insulinkonzentration in der Placebo-Gruppe bei der Nachuntersuchung signifikant ($p=0,006$) niedriger war als bei der Erstuntersuchung.

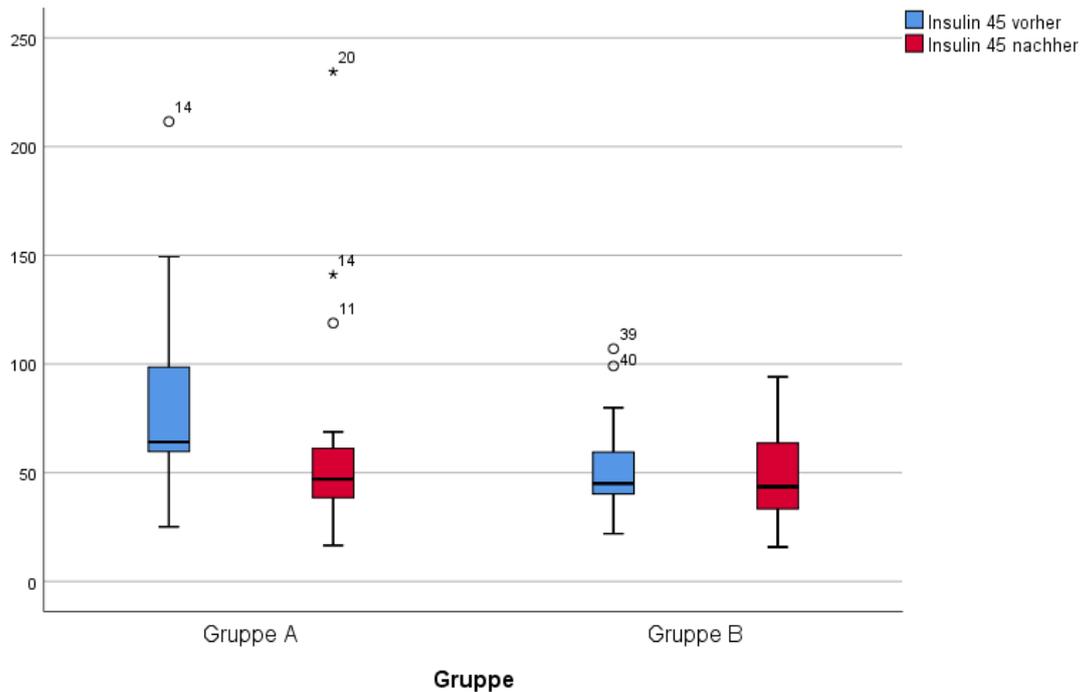


Abbildung 9: Vergleich stimuliertes Insulin vorher/nachher zwischen den Gruppen A & B.

Im T-Test für unabhängige Stichproben zeigten die Insulin-Vorher-Werte einen signifikanten ($p=0,013$) Unterschied zwischen den Gruppen. Der Unterschied lag zwischen $7,04 \mu\text{U/ml} \pm 57,2 \mu\text{U/ml}$.

Mittels „One Sample Wilcoxon Signed Rank Test“ wurde ein signifikanter ($p=0,006$) Unterschied zwischen den Vorher- und Nachher-Werten ($Differenz_{\text{vorher-nachher}}$) in der Placebo-Gruppe festgestellt. Insulin 45 war im Rahmen der Nachuntersuchung im Mittel $20,5 \mu\text{U/ml}$ niedriger als vorher.

4.2.1.4. RISQI

Der Mittelwert lag im Rahmen der Erstuntersuchung bei $0,42 \pm 0,15$, bei der Nachuntersuchung bei $0,42 \pm 0,13$. Insgesamt lag bei 21,94% (9/41) der Pferde im Rahmen der Erstuntersuchung eine kompensierte Insulinresistenz vor, davon waren 7 Pferde in der Placebo-Gruppe und 2 Pferde in der Verum-Gruppe. Bei der Nachuntersuchung hatten insgesamt 9 Pferde eine kompensierte Insulinresistenz und ein Pferd eine nicht kompensierte. Dieses eine Pferd war in der Placebo-Gruppe. Weitere 6 Pferde zeigten in der Placebo-Gruppe die kompensierte Form. In der Verum-Gruppe waren 3 Pferde von der kompensierten Insulinresistenz betroffen (Tabelle 10).

Tabelle 10: RISQI.

RISQI	MW / SD		Min / Max		95% Konfidenzintervall Obere/untere Grenze		Differenz (Median/IQR)
	vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher	
Gesamt	0,42/0,15	0,42/0,13	0,24/1,05	0,2/0,75	0,38/0,47	0,38/0,47	-0,03/0,09
	n(9) kompensiert	n(9) kompensiert n(1) nicht kompensiert					
Placebo- Gruppe	0,39/0,13	0,42/0,15	0,24/0,72	0,2/0,75	0,34/0,45	0,36/0,49	-0,03/0,1
	n(7) kompensiert	n(6) kompensiert n(1) nicht kompensiert					
Verum- Gruppe	0,46/0,18	0,43/0,11	0,26/1,05	0,3/0,6	0,37/0,54	0,37/0,48	-0,01/0,1
	n(2) kompensiert	n(3) kompensiert					

Der ermittelte Mittelwert und die Standardabweichung lagen in der Placebo-Gruppe bei der Erstuntersuchung bei $0,39 \pm 0,13$ und im Rahmen der Nachuntersuchung bei $0,42 \pm 0,15$. In der Verum-Gruppe lagen der Mittelwert und die Standardabweichung im Rahmen der Erstuntersuchung bei $0,46 \pm 0,18$ und Nachuntersuchung bei $0,43 \pm 0,11$.

Der „One Sample Wilcoxon Signed Rank Test“ zeigte eine signifikante ($p=0,042$) Erhöhung der Nachher-Werte. Die Nachher-Werte waren im Mittel 0,033 höher in der Placebo-Gruppe. In der Verum-Gruppe konnte keine signifikante Veränderung zwischen der Erst- und Nachuntersuchung erzielt werden.

4.2.1.5. MIRG

Die gesamte Studienpopulation wies zu Studienbeginn einen errechneten Mittelwert von $3,98 \pm 1,68$ und zu Studienende von $4,12 \pm 2,23$ auf. Insgesamt zeigten im Rahmen der Erstuntersuchung 14,63% (6/41) der Pferde eine kompensatorische Erhöhung der Insulin-Werte. Davon waren alle 6 in der Placebo-Gruppe. Im Rahmen der Nachuntersuchung wiesen 18,42% (7/38) der Pferde eine kompensatorische Erhöhung der Insulinwerte auf, wovon 5 Pferde in der Placebo-Gruppe und 2 Pferde in der Verum-Gruppe waren (Tabelle 11).

Tabelle 11: MIRG.

MIRG	MW / SD		Min / Max		95% Konfidenzintervall Obere/untere Grenze		Differenz (Median/IQR)
	vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher	
Gesamt	3,98/1,68	4,12/2,23	1,67/8,26	1,61/13,58	3,45/4,51	3,39/4,86	0,09/0,81
	n(6) > 5,6	n(7) > 5,6					
Placebo-Gruppe	4,49/1,84	4,53/2,67	1,87/8,26	2,06/13,58	3,67/5,31	3,35/5,72	0,24/0,88
	n(6) > 5,6	n(5) > 5,6					
Verum-Gruppe	3,4/1,29	3,56/1,32	1,67/5,58	1,61/6,38	2,78/4,02	2,86/4,27	-0,15/0,75
	n(0) > 5,6	n(2) > 5,6					

Der T-Test für unabhängige Stichproben zeigte zwischen den Gruppen vor dem Applikationszeitraum einen signifikanten Unterschied ($p=0,037$).

Auch hier wurde mittels „One Sample Wilcoxon Signed Rank Test“ untersucht, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen den Vorher- und Nachher-Werten ($Differenz_{vorher-nachher}$) gab – einmal für die gesamte Studienpopulation und einmal separat für jede Gruppe. Hier konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

4.2.2. Weitere erhobene Blutparameter

4.2.2.1. Magnesium im Serum

Im Mittel lag der Mg-Wert bei der gesamten Studienpopulation zu Beginn bei $0,67 \text{ mmol/l} \pm 0,08 \text{ mmol/l}$. Nach der Placebo-/Verum-Gabe lag der Mittelwert bei $0,69 \text{ mmol/l} \pm 0,08 \text{ mmol/l}$. Alle Pferde lagen mit ihren Nüchtermagnesium-Werten innerhalb des Referenzbereiches (Tabelle 12). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Erstuntersuchung und der Nachuntersuchung festgestellt werden.

Tabelle 12: Nüchternmagnesium (mmol/l).

Mg ZP 0 (mmol/l)	MW / SD		Min / Max		95% Konfidenzintervall Obere/untere Grenze		Differenz (Median/IQR)
	vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher	
Gesamt	0,67/0,08	0,69/0,08	0,5/0,8	0,5/0,9	0,65/0,7	0,67/0,72	0/0,13
Placebo-Gruppe	0,67/0,08	0,7/0,09	0,5/0,8	0,5/0,9	0,64/0,71	0,66/0,74	0/0,1
Verum-Gruppe	0,67/0,08	0,69/0,07	0,5/0,8	0,6/0,8	0,64/0,71	0,65/0,73	0/0,2

4.2.2.2. Triglyzeride und GGT

Insgesamt waren bei 24,39% (10/41) der Pferde die GGT-Werte im Rahmen der Erstuntersuchung erhöht. Im Durchschnitt lag der Mittelwert bei 19,67 U/l \pm 32,34 U/l. Nach der Verum-/Placebo-Gabe war der GGT-Wert bei 28,95% (11/38) der Pferde erhöht. Im Durchschnitt lag der Mittelwert bei 23,48 U/l \pm 34,98 U/l. Außerdem konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Erst- und Nachuntersuchung festgestellt werden. In Tabelle 13 sind die Mittelwerte und Werte der Standardabweichung aufgeführt. "n" beschreibt die Anzahl der Tiere, die einen erhöhten basalen GGT-Wert haben.

Tabelle 13: Basale GGT (U/l).

GGT (U/l)	Mittelwert \pm SD	
	Vorher	Nachher
Gesamt	19,67 \pm 32,34	23,48 \pm 34,98
	n(10) > 20 U/l	n(11) > 20 U/l
Placebo-Gruppe	18,72 \pm 36,9	18,95 \pm 34,91
	n(3) > 20 U/l	n(4) > 20 U/l
Verum-Gruppe	20,76 \pm 27,08	29,71 \pm 35,21
	n(7) > 20 U/l	n(7) > 20 U/l

Der basale TG-Wert war lediglich bei insgesamt 12,2% (5/41) der Pferde im Rahmen der Erstuntersuchung erhöht, im Rahmen der Nachuntersuchung bei 10,53% (4/38) der Pferde. Hier konnte auch kein signifikanter Unterschied zwischen der Erst- und Nachuntersuchung festgestellt werden. In Tabelle 14 ist mit "n" die Anzahl der Pferde mit einem erhöhten TG-Wert aufgeführt.

Tabelle 14: Basale Hypertriglyzeridämie (mg/dl).

TG (mg/dl)	Vorher	Nachher
Gesamt	n(5) > 70 mg/dl	n(4) > 70 mg/dl
Placebo-Gruppe	n(3) > 70 mg/dl	n(2) > 70 mg/dl
Verum-Gruppe	n(2) > 70 mg/dl	n(2) > 70 mg/dl

4.2.2.3. Fruktosamin

Im Rahmen der Erstuntersuchung zeigten lediglich 7,32% (3/41) der Pferde einen erhöhten Fruktosamin-Wert. Im Rahmen der Nachuntersuchung war es nur ein Pferd. In Tabelle 15 wurden die Mittelwerte, die Standardabweichung, Min. und Max, das 95% Konfidenzintervall für die gesamte Studienpopulation und die jeweilige Gruppe ermittelt, sowie die Differenz (*Differenz_{vorher-nachher}*).

Mittels „One-Sample Wilcoxon Signed Rank Test“ wurden Unterschiede zwischen vorher und nachher ermittelt, sowohl für die gesamte Studienpopulation als auch für die einzelnen Gruppen. Hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Erst- und der Nachuntersuchung festgestellt werden.

Tabelle 15: Basale Fruktosamin-Werte (µmol/l).

Fruktosamin (µmol/l)	MW / SD		Min / Max		95% Konfidenzintervall Obere/untere Grenze		Differenz (Median/IQR)
	vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher	
Gesamt	313,96/38,57	321,78/22,67	153,2/368,5	278,9/385,3	301,79/326,14	314,33/329,23	-6,3/36,43
	n(3) > 360	n(1) > 360					
Placebo-Gruppe	314,41/30,21	317,38/25,36	238,7/368,5	278,9/385,3	301,01/327,8	306,14/328,62	-4,5/34,65
	n(1) > 360	n(1) > 360					
Verum-Gruppe	313,45/47,37	327,82/17,32	153,2/368,3	293,2/349,4	290,63/336,26	318,59/337,05	-8,05/35
	n(2) > 360	n(0) > 360					

4.2.3. Zellisolation

4.2.3.1. Zellzahl

Die Isolation der Blutlymphozyten war aus allen Proben der Erstuntersuchung möglich. Lediglich bei einer Probe der Nachuntersuchung konnte die Isolation der Blutlymphozyten aufgrund von laboratorischen Problemen nicht durchgeführt werden. Die Gesamtzellzahl variierte in der Voruntersuchung zum Zeitpunkt 0 zwischen $5,1 \times 10^5$ – $2,14 \times 10^7$ Zellen/ml mit einem durchschnittlichen Prozentsatz von 81% an lebenden Zellen. Zum Zeitpunkt 45 in der Erstuntersuchung variierte die Zellzahl zwischen $1,95 \times 10^5$ – $3,02 \times 10^7$ Zellen/ml. Hier betrug der durchschnittliche Prozentsatz an lebenden Zellen 83%. Bei der Nachuntersuchung zum Zeitpunkt 0 ergab sich eine Zellzahl zwischen $1,52 \times 10^5$ – $1,85 \times 10^7$ Zellen/ml mit einem durchschnittlichen Prozentsatz an lebenden Zellen von 86%. Zum Zeitpunkt 45 lag die Zellzahl zwischen $1,14 \times 10^5$ – $3,91 \times 10^7$ Zellen/ml und ergab einen durchschnittlichen Prozentsatz von 87% an lebenden Zellen.

4.2.3.2. Intrazelluläres Magnesium

4.2.3.2.1. Intrazelluläres Magnesium zum Zeitpunkt 0

Bei den 41 an EMS erkrankten Pferden ließ sich insgesamt ein durchschnittlicher intrazellulärer Magnesiumgehalt von $0,24 \text{ mmol/l} \pm 0,06 \text{ mmol/l}$ ermitteln. Es lag lediglich bei 4,88% (2/41) der Pferde ein Magnesiummangel auf zellulärer Ebene vor. Der zuvor definierte Referenzbereich lag bei $0,16 \text{ mmol/l} - 0,42 \text{ mmol/l}$ (Winter et al. 2018). Es gab insgesamt keinen signifikanten Anstieg der intrazellulären Magnesiumwerte – weder in der Placebo-Gruppe noch in der Verum-Gruppe. Tabelle 16 zeigt die Mittelwerte, SD, Minimum und Maximum, 95% Konfidenzintervall sowie die ermittelten Differenzen für die gesamte Studienpopulation und einzeln für die jeweilige Gruppe. Bei der Nachuntersuchung konnte lediglich von 37 Pferden der intrazelluläre Magnesiumgehalt gemessen werden.

Tabelle 16: Basales intrazelluläres Magnesium zum Zeitpunkt 0 (mmol/l).

Mg i.z. ZP 0 (mmol/l)	MW / SD		Min / Max		95% Konfidenzintervall Obere/untere Grenze		Differenz (Median/IQR)
	vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher	
Gesamt	0,24/0,06	0,24/0,08	0,13/0,41	0,11/0,48	0,22/0,26	0,21/0,26	0,01/0,11
Placebo-Gruppe	0,25/0,06	0,22/0,07	0,17/0,41	0,11/0,41	0,22/0,28	0,19/0,26	0,02/0,1
Verum-Gruppe	0,23/0,06	0,26/0,08	0,13/0,32	0,14/0,48	0,2/0,25	0,21/0,3	-0,03/0,13

4.2.3.2.2. Intrazelluläres Magnesium zum Zeitpunkt 45

Der durchschnittliche Gesamtwert des stimulierten intrazellulären Magnesiums lag bei 0,23 mmol/l \pm 0,09 mmol/l vor der Placebo-/Verum-Applikation. Insgesamt zeigten im Rahmen der Erstuntersuchung 14,6% (6/41) der Pferde auf zellulärer Ebene einen Mangel an Magnesium zum Zeitpunkt 45. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Erstuntersuchung und der Untersuchung nach der 3-monatigen Fütterung des Placebo-/Verum-Präparates festgestellt werden. Tabelle 17 zeigt eine Übersicht der Mittelwerte mit der Standardabweichung, das Minimum und Maximum, das 95%ige Konfidenzintervall sowie die Differenz zwischen der Erst- und Nachuntersuchung.

Tabelle 17: Stimuliertes intrazelluläres Magnesium zum Zeitpunkt 45 (mmol/l).

Mg i.z. ZP 45 (mmol/l)	MW / SD		Min / Max		95% Konfidenzintervall Obere/untere Grenze		Differenz (Median/IQR)
	vorher	nachher	vorher	nachher	vorher	nachher	
Gesamt	0,23/0,09	0,22/0,06	0,11/0,48	0,12/0,36	0,2/0,26	0,2/0,23	0,01/0,1
Placebo-Gruppe	0,25/0,1	0,21/0,05	0,11/0,12	0,12/0,31	0,2/0,29	0,19/0,23	0,03/0,1
Verum-Gruppe	0,21/0,06	0,22/0,07	0,11/0,09	0,15/0,36	0,18/0,24	0,19/0,26	-0,01/0,13

4.2.3.2.3. Einflussfaktoren auf das intrazelluläre Magnesium

Mit Hilfe der linearen Regression wurde getestet, ob es bestimmte Faktoren gibt, die den intrazellulären Magnesiumgehalt beeinflussen. Die Einflussfaktoren, die genauer betrachtet wurden, waren die basale Glukose-Konzentration, das Ergebnis des cGITs, RISQI, MIRG, der basale Insulinwert, der stimulierte Insulinwert und der basale Fruktosamingehalt. Es wurde zunächst der intrazelluläre Magnesiumgehalt nach der Placebo-/Verum-Gabe, aber auch der intrazelluläre Magnesiumgehalt vor der Placebo-/Verum-Gabe sowie die Magnesiumdifferenz von vorher und nachher als stetige Variable betrachtet.

Die Nullhypothese, die besagte, dass kein linearer Zusammenhang zwischen dem intrazellulären Magnesiumgehalt und der entsprechenden Variable besteht, konnte nur in der Placebo-Gruppe in bestimmten Fällen abgelehnt werden. Die Verum-Gruppe erbrachte keine signifikanten Zusammenhänge. Im Folgenden werden nur die Einflussgrößen erwähnt, die einen signifikanten Einfluss auf die stetige Variable hatten.

4.2.3.2.3.1. Magnesium intrazellulär nach Placebo-/Verum-Gabe

Mittels linearer Regressionsanalyse wurde ein möglicher Einfluss verschiedener Parameter auf die intrazelluläre Magnesiumkonzentration nach der Placebo-/Verum-Gabe beurteilt. In Gruppe A (Placebo-Gruppe) wurden signifikante Zusammenhänge festgestellt.

Das Ergebnis der univariablen Regressionsanalyse ergab, dass der kombinierte Glukose-Insulin-Toleranztest einen positiven Effekt auf die intrazelluläre Magnesiumkonzentration hatte. Mit einem p-Wert von Null wurde die Alternativhypothese angenommen. Das bedeutet, dass Magnesium intrazellulär um 0,001 mmol/l anstieg, wenn das Ergebnis des cGITs um 1 stieg (Tabelle 18). Abbildung 10 zeigt den Einfluss des cGITs auf den intrazellulären Magnesiumgehalt in Gruppe A.

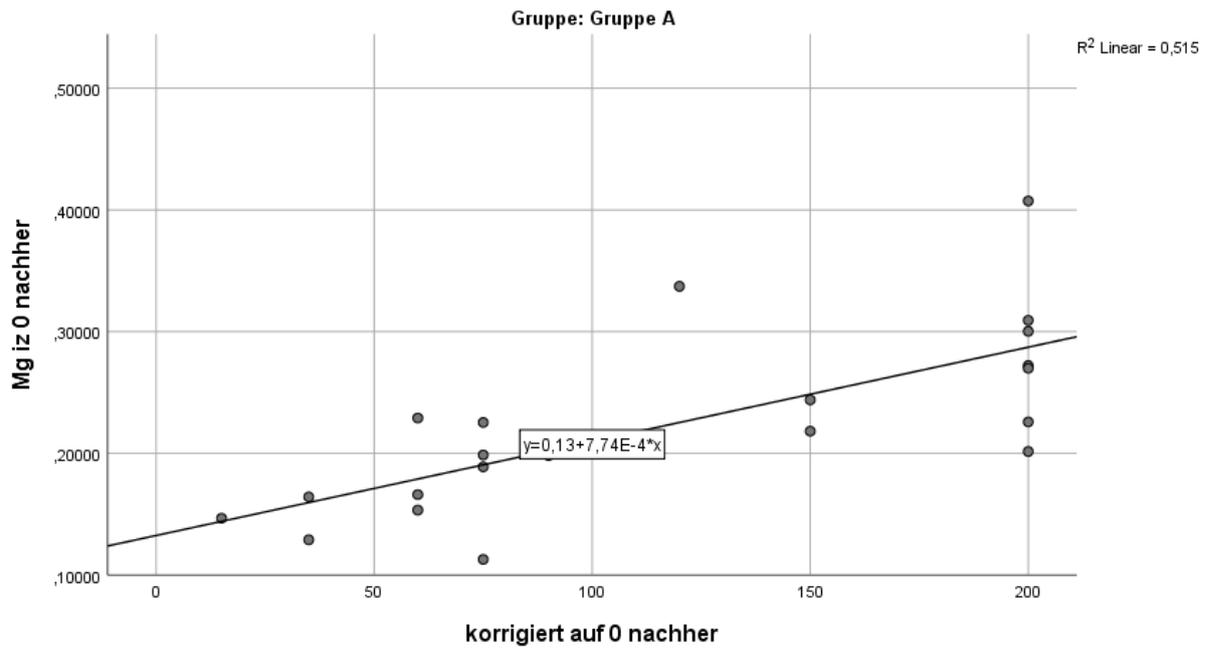


Abbildung 10: Lineare Regression (Einfluss cGIT auf intrazellulären Magnesiumgehalt nach Placebo-Gabe).

Tabelle 18: Übersicht Signifikanz und Regressionskoeffizient.

Koeffizienten ^{a,b}						
Modell	Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten	T	Sig.	
	Regressionskoeffizient B	Std.-Fehler	Beta			
1	(Konstante)	,133	,023		5,691	,000
	korrigiert auf 0 nachher	,001	,000	,717	4,488	,000

a. Gruppe = Gruppe A

b. Abhängige Variable: Mg iz 0 nachher

Ein signifikanter ($p=0,045$) Zusammenhang wurde auch im Rahmen der univariablen Regressionsanalyse zwischen dem errechneten RISQI Wert nach der Placebo-Gabe und dem intrazellulären Magnesiumgehalt zum gleichen Zeitpunkt festgestellt. Somit wurde die Nullhypothese abgelehnt. Es wird angenommen, dass ein negativer Zusammenhang zwischen dem intrazellulären Magnesiumgehalt und RISQI besteht. Das heißt, dass Magnesium intrazellulär um 0,219 mmol/l sank, wenn RISQI um 1 stieg. Dies verdeutlicht Abbildung 11.

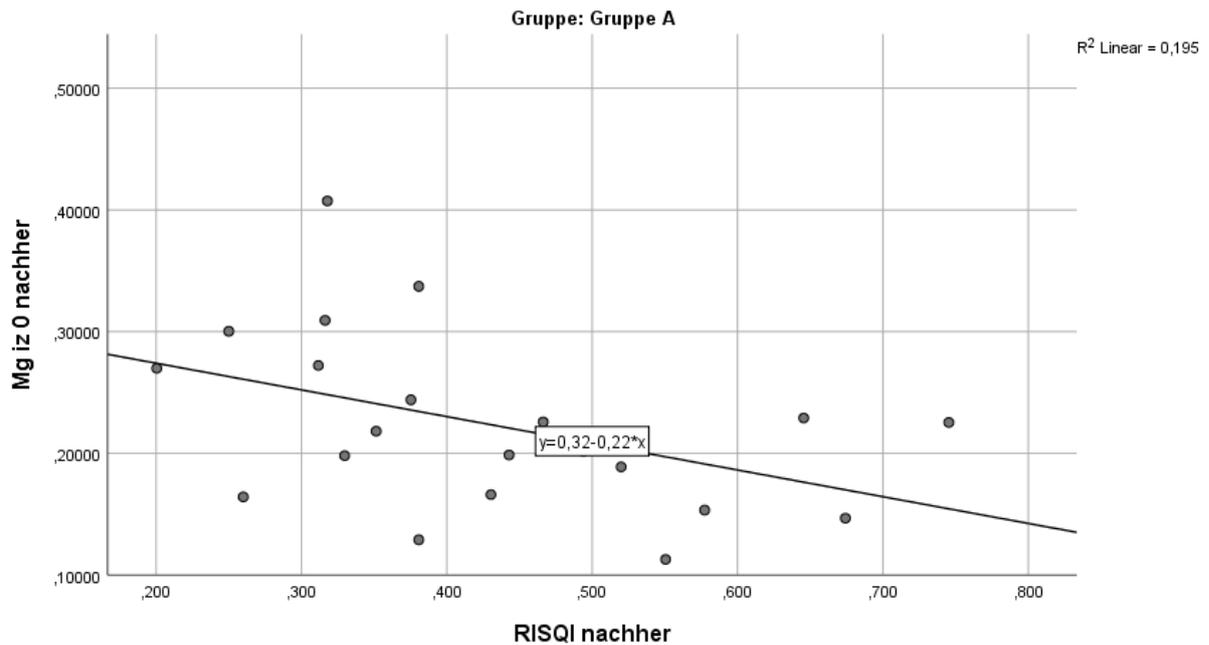


Abbildung 11: Lineare Regression (Einfluss RISQI auf das intrazelluläre Magnesium nach Placebo-Gabe).

In der Placebo-Gruppe konnte außerdem im Rahmen der univariablen Regressionsanalyse mit einer grenzwertigen Signifikanz ($p=0,07$) ein Einfluss vom Nüchtern-Insulin-Wert auf das intrazelluläre Magnesium nach der Placebo-Gabe festgestellt werden. Hierbei stieg der intrazelluläre Magnesiumgehalt um $0,005$ mmol/l, wenn Insulin um 1 anstieg. Ein eindeutiger signifikanter ($p=0,019$) Zusammenhang im Rahmen der univariablen Regressionsanalyse konnte zwischen dem Nüchtern-Fruktosamin-Wert und dem intrazellulären Magnesiumgehalt gezeigt werden. In Abbildung 12 wird der lineare Zusammenhang bildlich dargestellt. Hierbei stieg der intrazelluläre Magnesiumgehalt um $0,019$ mmol/l an, wenn die Fruktosamin-Konzentration um 1 stieg.

In der multivariablen Regressionsanalyse wurde das intrazelluläre Magnesium nach der Placebo-Gabe als abhängige Variable gesehen. Die unabhängigen Variablen, die in diesem Zusammenhang analysiert worden sind, waren Fruktosamin, das Ergebnis des cGITs, Nüchtern-Insulin, stimuliertes Insulin und MIRG. Hier waren lediglich in der Placebo-Gruppe Fruktosamin ($p=0,041$, $b=0,002$) und das Ergebnis des cGITs ($p=0,011$, $b=0,001$) signifikant, sodass davon auszugehen ist, dass hier eine Assoziation vorliegt. RISQI konnte aufgrund der hohen Korrelation mit dem Nüchtern-Insulin nicht in das Modell der multivariablen Regressionsanalyse mit einbezogen werden.

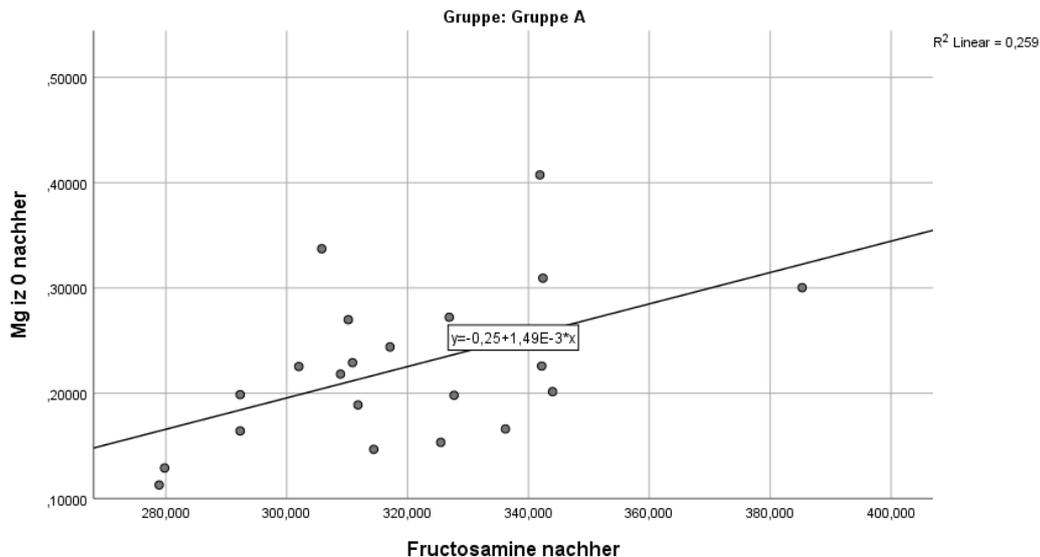


Abbildung 12: Lineare Regression (Einfluss von Fructosamin auf den intrazellulären Magnesiumgehalt nach Placebo-Gabe).

4.2.3.2.3.2. Magnesium intrazellulär Differenz

Der Einfluss der verschiedenen Parameter auf die stetige Variable der intrazellulären Magnesiumdifferenz zwischen der Erst- und Nachuntersuchung wurde ebenfalls ermittelt. In der gesamten Studienpopulation konnte ein Einfluss vom stimulierten Insulin vor der Placebo-/Verum-Verabreichung ($p=0,023$) sowie vom Ergebnis des cGITs nach der Placebo-/Verum-Verabreichung ($p=0,033$) festgestellt werden. Die Differenz des intrazellulären Magnesiums stieg um 0,001 mmol/l, wenn das stimulierte Insulin um 1 stieg und sank um 0,001 mmol/l, wenn das Ergebnis des cGITs um 1 stieg.

Der Einfluss in den einzelnen Gruppen ergab in der Placebo-Gruppe ein signifikantes Ergebnis. Das Ergebnis des cGITs hatte einen signifikanten Einfluss ($p=0,012$) auf die Differenz des intrazellulären Magnesiumgehaltes. Die Differenz sank um 0,01 mmol/l, wenn das Ergebnis des cGITs um 1 stieg, d.h. dass mit höherem Ergebnis des cGITs die intrazelluläre Magnesiumdifferenz sank.

4.2.3.2.3.3. Magnesium intrazellulär vor Placebo-/Verum-Verabreichung

Die Einflussfaktoren auf das intrazelluläre Magnesium vor der Placebo-/Verum-Verabreichung wurde mittels linearer Regression ermittelt. Hier gab es ein signifikantes Ergebnis für die gesamte Studienpopulation für das Nüchterninsulin ($p=0,005$), das stimulierte Insulin

($p=0,008$), RISQI ($p=0,013$), MIRG ($p=0,006$). Die Einflussfaktoren sind die ermittelten Werte vor der Placebo-/Verum-Verabreichung.

Magnesium intrazellulär stieg um $0,006$ mmol/l, wenn das Nüchterninsulin um 1 stieg. Es stieg außerdem um $0,001$ mmol/l, wenn das stimulierte Insulin um 1 stieg. RISQI hatte einen negativen Einfluss auf das intrazelluläre Magnesium vor der Placebo-/Verum-Gabe. Es sank um $0,151$ mmol/l, wenn RISQI um 1 stieg. MIRG hatte einen positiven Effekt. Hier stieg der intrazelluläre Magnesiumgehalt vor der Verum-/Placebo-Gabe um $0,015$ mmol/l an, wenn MIRG um 1 stieg.

Auf die einzelnen Gruppen beschränkt lag eine Signifikanz in der Placebo-Gruppe vor. Hier hatte das Nüchterninsulin einen signifikant ($p=0,003$) positiven Einfluss auf das intrazelluläre Magnesium vor der Placebo-/Verum-Verabreichung. In Abbildung 13 ist der Verlauf der Linearen eingezeichnet. Magnesium intrazellulär stieg um $0,008$ mmol/l, wenn das Nüchterninsulin um 1 stieg.

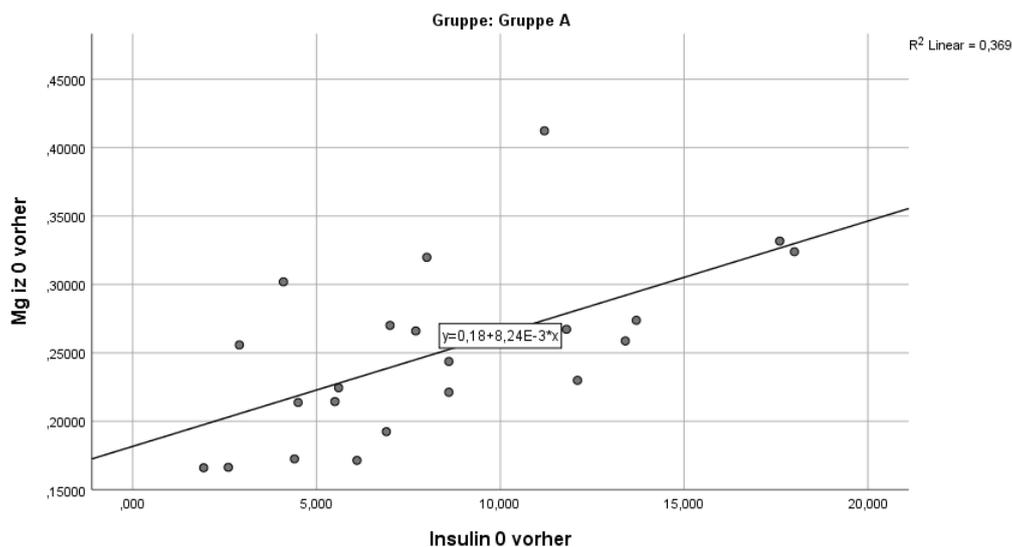


Abbildung 13: Lineare Regression (Einfluss von Nüchterninsulin auf den intrazellulären Magnesiumgehalt vor der Placebo-/Verum-Gabe).

Das stimulierte Insulin hatte einen positiven Einfluss auf die intrazelluläre Magnesiumkonzentration vor der Placebo-/Verum-Gabe. Das Ergebnis war signifikant ($p=0,021$). Das intrazelluläre Magnesium stieg um $0,001$ mmol/l, wenn das stimulierte Insulin um 1 anstieg. RISQI hatte im Gegensatz dazu einen negativen signifikanten ($p=0,005$) Effekt auf das intrazelluläre Magnesium. Hier sank Magnesium in der Zelle um $0,285$ mmol/l, wenn RISQI um 1 anstieg. Dies ist in Abbildung 14 zu sehen.

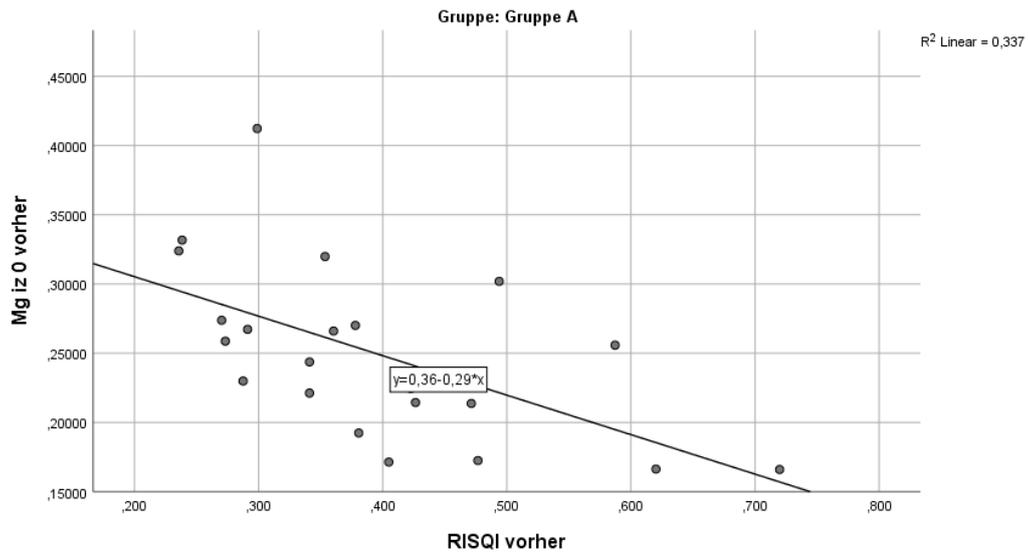


Abbildung 14: Lineare Regression (Einfluss von RISQI auf den intrazellulären Magnesiumgehalt vor der Placebo-/Verum-Gabe).

MIRG hatte wiederum einen positiven Einfluss auf den intrazellulären Magnesiumgehalt ($p=0,002$). Hier stieg der intrazelluläre Magnesiumgehalt um 0,022 mmol/l an, wenn MIRG um 1 stieg.

4.3. Nebenwirkungen

In der Verum-Gruppe zeigte ein Pferd eine Tendenz zu breiigem Kotabsatz. Weitere Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet.

Die Akzeptanz des in Gruppe B verabreichten Verumpräparates war mäßig. 3 Pferde wurden wegen Nicht-Akzeptanz von der Studie ausgeschlossen. Diese 3 Pferde fraßen das Verumpräparat nicht. Hier gibt es keine Daten der Nachuntersuchung.

4.4. Fazit

Folgende Ergebnisse können festgehalten werden:

- Die Nüchtern glukose-Konzentrationen nach dem 3-monatigen Applikationszeitraum unterscheiden sich signifikant ($p=0,029$) zwischen den Gruppen. Die Konzentration der Placebo-Gruppe war niedriger als die der Verum-Gruppe.
- Die Ergebnisse des cGITs zeigten ein ähnliches Ergebnis in der Verum-Gruppe bei der Erst- und bei der Nachuntersuchung. Die Ergebnisse der Placebo-Gruppe zeigten eine signifikante ($p=0,045$) Verringerung.
- Bei der Untersuchung des stimulierten Insulins (Zeitpunkt 45 Minuten) zeigte die Placebo-Gruppe in der Nachuntersuchung eine signifikant ($p=0,006$) niedrigere Konzentration als bei der Erstuntersuchung.
- Die Auswertung der errechneten RISQI-Werte ergaben in der Placebo-Gruppe eine signifikante ($p=0,042$) Erhöhung im Rahmen der Nachuntersuchung.
- Es konnte weder zum Zeitpunkt 0 noch zum Zeitpunkt 45 ein signifikanter Unterschied zwischen der intrazellulären Magnesiumkonzentration in der Erst- und Nachuntersuchung festgestellt werden.
- Die getesteten Einflussfaktoren auf das intrazelluläre Magnesium zeigten keinen signifikanten Zusammenhang in der Verum-Gruppe.

Zusammenfassend konnte festgehalten werden, dass in unserer Studie kein Anstieg der Serum- und intrazellulären Magnesiumkonzentration nach einer 3-monatigen Applikation des Verum-Präparates erreicht wurde. Außerdem konnte kein Effekt auf Parameter der Insulinsensitivität festgestellt werden.

5. Diskussion

5.1. Auswahl der Studienpopulation

In diese Studie wurden alle positiv auf das Equine metabolische Syndrom getesteten Pferde (n=41) in dem Zeitraum August 2016 bis März 2018 aufgenommen d.h. der Glukoseruhewert wurde nach 75 Minuten im Rahmen des kombinierten Glukose-Insulin-Toleranztestes nicht erreicht. Diese Pferde zeigten außerdem alle phänotypische Merkmale, die typisch für das Equine metabolische Syndrom sind (Henneke et al. 1983, Carter et al. 2009, Frank et al. 2010). Es konnten allerdings auch 10 Pferde, die äußerlich klare Kriterien eines EMS zeigten, negativ getestet werden. In der Literatur wurden auch Fälle des Equinen metabolischen Syndroms beschrieben, die phänotypisch keine Anzeichen aufwiesen (Frank et al. 2010).

Die 3-monatige Fütterung des Verum-/Placebo-Präparates erbrachte keine signifikante Veränderung im BCS, CNS und Gewicht. Lediglich eine Tendenz in der Gewichtsreduktion konnte festgestellt werden. So hatten im Durchschnitt die Pferde der Verum-Gruppe 10,23 kg zugenommen, die Pferde der Placebo-Gruppe zeigten eine geringfügige Gewichtsabnahme (3,14 kg). Man kann hier nur von einer geringfügigen Abnahme sprechen, ob diese eine klinische Relevanz hat, ist fraglich. Bei solch geringfügigen Gewichtsunterschieden gilt es den Einfluss der Futter- und Wasseraufnahme bzw. den Wasserverlust, den Einfluss des Kotabsatzes/der Kotabsatzmenge, die Bewegung sowie die Präzision der Waage zu hinterfragen.

Positiv getestete Tiere wurden so definiert, dass der Glukoseruhewert erst nach 75 Minuten wieder erreicht wurde und/oder der Nüchtern-Insulin-Wert und/oder die stimulierte Insulinkonzentration über dem Referenzbereich lag. In einer Studie von Bröjer et al. wurde gezeigt, dass die Glukose-Parameter eine geringe Wiederholbarkeit zeigen und verschiedenen Einflüssen ausgesetzt sind. So können diese Werte durch Stress, aber auch durch die Rasse beeinflusst werden (Brojer et al. 2013). Somit ist die alleinige Einschätzung der Insulindysregulation anhand der Glukose-Kurve fehleranfällig. Die Insulinkonzentration ist besser reproduzierbar als die Glukose-Konzentration, weshalb in unserer Studie auch der Nüchterninsulin-Wert, das stimulierte Insulin, sowie die Proxies (RISQI, MIRG) betrachtet wurden (Brojer et al. 2013).

Alle Pferde unserer Studie wurden zuvor auf Schmerzhaftigkeiten im Hufbereich in Bezug auf eine akute Hufrehe untersucht. In der Humanmedizin wurde bereits ein Zusammenhang zwischen akutem Schmerz und der Entwicklung einer Insulinresistenz bestätigt (Greisen et al. 2001). In unserer Studie konnten keinerlei Schmerzzeichen festgestellt werden. Die

Venenkatheter wurden unter Lokalanästhesie geschoben, um den Stresseinfluss so gering wie möglich zu halten. Vermutlich bestand bei allen Pferden aufgrund der ungewohnten Umgebung ein geringgradig erhöhtes Stresslevel.

Ein weiterer möglicher Einflussfaktor der Ergebnisse könnte der basale ACTH-Wert gewesen sein. Dieser wurde zwar gemessen, allerdings führte eine Erhöhung nicht zum Ausschluss aus der Studie, sodass 7 Pferde bei der Eingangsuntersuchung einen erhöhten ACTH-Wert hatten und dennoch an der Studie teilgenommen haben. Hiervon befanden sich 3 Pferde in der Placebo-Gruppe und die übrigen in der Verum-Gruppe, wovon eines nicht zur Nachkontrolle erschienen war. Eine Insulindysregulation kann auch bei einer PPID (pars pituitary intermedia dysfunction) vorkommen, somit wäre es gut gewesen, die betroffenen Tiere klar abzugrenzen (Walsh et al. 2009, McFarlane 2011). Da es allerdings schwierig war, ausreichend Patienten für unsere Studie zu gewinnen und die ACTH-Messungen in einem Fremdlabor durchgeführt wurden und uns somit die Ergebnisse erst nach der umfangreichen Zellisolation und Untersuchung zur Verfügung standen, wurde davon abgesehen, diese Pferde von der Studie auszuschließen. Ein erhöhter ACTH-Wert im Spätsommer und Herbst ist zudem mit Vorsicht zu interpretieren, da der ACTH-Wert saisonalen Einflüssen unterliegt. Ein veränderter ACTH-Wert muss also immer gemeinsam mit anderen Kriterien gesehen werden (Place et al. 2010). Es muss allerdings nicht zwingend so sein, dass eine „Pars pituitary intermedia dysfunction“ immer mit einer Beeinträchtigung der Insulinsensitivität einhergeht (Mastro, Adams, and Urschel 2015). Dieses Syndrom tritt vorwiegend bei älteren (meist 18-20 Jahre) Pferden auf (Orth et al. 1982, Schott 2002, McFarlane 2011). Alle an der Studie teilnehmenden Pferde zeigten zudem keine klinischen Anzeichen einer PPID (Hypertrichie, Hängebauch, supraorbitale Fettansammlungen, Anzeichen einer akuten und chronischen Hufrehe).

5.2. Durchführung des cGIT

Zur Diagnostik eines EMS-Patienten wurde nach dem zuvor beschriebenen standardisierten Protokoll des cGITs die erkrankten Pferde identifiziert. Dieser Test zeigte nach einer Studie von Dunbar et al. eine besonders gute Sensitivität und Spezifität (Dunbar et al. 2016).

In der Literatur wurde der FSIGTT sowie EHC als Goldstandard beschrieben. Diese beiden Tests sind allerdings sehr teuer, aufwendig und in der Praxis nicht gut umsetzbar (Toth et al. 2009, Dunbar et al. 2016). Obwohl diese Tests präziser sind, wurde in der vorliegenden Studie der cGIT zur Diagnostik genutzt. Dieser ist einfach und in der Praxis deutlich realistischer durchführbar. Allerdings sollte zukünftig zur Einschätzung der Insulindysregulation auch der Insulin-Parameter herangezogen werden.

Im Rahmen des cGITs wird die physiologische Aufnahme der Glukose und somit die enteroinsuläre Achse umgangen. Außerdem gibt es keinen Einfluss durch die Magenentleerung und die Passagezeit (Marks et al. 1991, Duhlmeier et al. 2001, Morgan et al. 2016). Allerdings ist diese Umgehung entgegen des physiologischen Weges. Dühlmeier et al. zeigten in einer Studie, dass die totale Insulinsekretion verglichen zur intravenösen Applikation signifikant höher nach der oralen Aufnahme der Glukose war (Duhlmeier et al. 2001). Ob die Korrelation zwischen der Insulinkonzentration und der des GLP-1 eine verminderte Insulinsensitivität reflektiert oder ob die Insulinkonzentration von der steigenden GLP-1 Menge beeinflusst wird, wurde noch nicht abschließend geklärt (Bamford et al. 2015). Somit kann man mit diesem Test eher von einer Insulindysregulation sprechen und nicht bei positivem Ergebnis von einer Insulinresistenz. Aufgrund dieser Umgehung der enteroinsulären Achse könnten somit die Ergebnisse etwas verzerrt sein. Der OGT/OST wird durch die Magenentleerung und die Glukoseabsorption im Dünndarm beeinflusst (Kronfeld et al. 2005). Außerdem spielt bei den oralen Tests, besonders den in-feed Tests, die Akzeptanz des Pferdes eine bedeutende Rolle (de Laat et al. 2016) und somit auch die Aufnahmezeit. Bei der Eingabe über die Nasenschlundsonde hingegen ist die Aufnahmezeit und die Aufnahmemenge klar definierbar. Allerdings könnte man annehmen, dass in diesem Zusammenhang der Faktor Stress mit einspielt. Eine Studie von Warnken et al. zeigte, dass auch wenn bei Manipulation an der Nasenschlundsonde im Rahmen des OGT die Cortisolwerte anstiegen, die Pferde die Basalwerte schnell wieder erreichten. Der Einfluss von Stress auf die Testergebnisse ist noch nicht vollständig geklärt (Warnken et al. 2018b). Mit dem cGIT werden diese äußeren Einflüsse, sowie die Magenentleerung/-verweildauer umgangen. Der OST ist in erster Linie ein Test, um die Antwort der β -Zellen des Pankreas widerzuspiegeln und gibt wenig Information über die Insulinsensitivität (Lindase et al. 2017).

Die Wiederholbarkeit und die Vergleichbarkeit der Tests sind aufgrund des strengen Protokolls gut möglich. Allerdings ist die Kurve der Glukose stärkeren Schwankungen ausgesetzt als die des Insulins (Brojer et al. 2013).

Der signifikante Unterschied ($p=0,045$) zwischen der Vor- und Nachuntersuchung zeigte, dass in der Placebo-Gruppe die Zeit zum Wiedererreichen des Glukosebasalwertes kürzer ist verglichen mit der Voruntersuchung. Das würde bedeuten, dass sich die Placebo-Gruppe im Gegensatz zur Verum-Gruppe verbessert hat. Hier muss allerdings erwähnt werden, dass sich bereits die Glukosekurven vor der Placebo-/Verum-Gabe zwischen den Gruppen signifikant ($p=0,008$) unterschieden haben. Die Placebo-Gruppe erreichte im Durchschnitt nach 154,09 Minuten und die Verum-Gruppe nach 119,74 Minuten den Glukosebasalwert wieder.

In einigen Studien, in denen der cGIT zur Diagnostik genutzt wurde, wurde der Katheter zur Applikation in die eine V. jugularis gelegt und der zur Blutentnahme in die Andere (Brojer et al. 2013), da die Möglichkeit besteht, dass die Glukose am Katheter haften bleibt, die man zuvor eingegeben hat. In unserer Studie wurde, um dem entgegenzuwirken, der Venenkatheter mittels 10 ml Natrium-Chlorid-Lösung unter Zusatz von Heparin-Natrium gespült.

Standardmäßig wird der cGIT mit dem humanen rekombinaten Insulin empfohlen, da aufgrund der Umwidnungskaskade das porcine Zink Insulin, das Caninsulin®, für Hunde und Katzen auf dem Markt ist, wurde dieses in dieser Studie für die Durchführung des cGITs verwendet. Hier sei allerdings zu beachten, dass dieses eine veränderte Kinetik aufweist und der Glukoseabfall im Vergleich zum rekombinaten humanen Insulin verzögert ist. Dementsprechend wurden die Zeiten des cGITs angepasst. Dies beruhte auf Schätzungen. Hierzu wurde unsererseits keine Untersuchung vorgenommen. Die hierzu durchgeführten Studien wurden erst zu einem späteren Zeitpunkt veröffentlicht. In einer Studie von Warnken et al. wurde an gesunden Pferden gezeigt, dass die im Rahmen des mit dem porcinen Zink Insulin durchgeführten cGITs die Dynamik des Insulins und der Glukose verändert ist (Warnken et al. 2018b). In einer weiteren Studie wurde für den Insulinstimulationstest mit dem porcinen Zink Insulin der Cut-off-Wert angepasst. Hierzu sind noch nicht alle Details veröffentlicht (Grob et al. 2020).

5.3. Intrazelluläre Magnesiummessung

Neben der in unserer Studie durchgeführten intrazellulären Magnesiummessung in Blutlymphozyten, wurde in der Humanmedizin auch eine intrazelluläre Messung in Erythrozyten beschrieben. Im Vergleich zu der Messung in den Lymphozyten ist das Verfahren in den Erythrozyten mit deutlich weniger Aufwand verbunden (Stöckle et al. 2019). In der Veterinärmedizin, speziell für Pferde gibt es allerdings noch keine etablierten Referenzwerte für die intrazelluläre Magnesiumkonzentration (Stöckle et al. 2019). Hingegen wurde die intrazelluläre Magnesiummessung innerhalb der Blutlymphozyten bereits in der Pferdemedizin in Anlehnung an die etablierte Methode in der Humanmedizin (Delva et al. 1998) von Winter et al. etabliert (Winter et al. 2018). Im Rahmen dieser Studie wurden auch Referenzwerte für den intrazellulären Magnesiumgehalt in Lymphozyten festgelegt (Winter et al. 2018). In der Humanmedizin konnte bereits gezeigt werden, dass der Grad der Insulinresistenz mit der intrazellulären Magnesiumkonzentration in den Lymphozyten korreliert (Delva et al. 1998). In der Pferdemedizin konnten bisher nur Tendenzen festgestellt werden (Winter et al. 2016).

Die Messung der intrazellulären Magnesiumkonzentration innerhalb der Erythrozyten zeigte bereits in der Humanmedizin, dass die Konzentration nahrungsabhängig ist (Basso et al. 2000). In einer Studie von Stöckle et al. wurde gesunden Pferden Magnesiumaspartat-Hydrochlorid oral supplementiert und sowohl die intrazelluläre Magnesiumkonzentration in den Blutlymphozyten als auch in Erythrozyten gemessen. Hier konnte eine Tendenz gesehen werden, dass die intrazelluläre Magnesiumkonzentration in den Erythrozyten eher ansteigt als in den Lymphozyten. Allerdings war dies nicht signifikant und die Studienpopulation (n = 5) sehr klein (Stöckle et al. 2019). Es wurde bereits gezeigt, dass die intrazelluläre Magnesiumkonzentration in Erythrozyten verschiedenen Einflüssen unterliegt, wie dem Alter (Elin und Hosseini 1985), dem HLA Phänotyp (Nadler und Rude 1995) und der Aktivität der Natrium-Magnesium Austauschers (Widmer et al. 1995). Dies lässt vermuten, dass die Messung innerhalb der Blutlymphozyten verlässlicher und auch etablierter ist - v.a. in der Pferdemedizin (Stöckle et al. 2019). Für zuverlässige Messungen in den Erythrozyten beim Pferd bedarf es weiterer Studien.

In Bezug auf die in dieser Studie durchgeführte intrazelluläre Magnesiummessung innerhalb der Blutlymphozyten muss erwähnt werden, dass die Blutlymphozyten während der Aufbereitung in einem Medium belassen wurden, dem Magnesium zugesetzt wurde. Dies sollte dem Einfluss auf die intrazellulären Magnesiumkonzentration durch Osmose entgegenwirken. Inwieweit dies allerdings die intrazelluläre Magnesiumkonzentration beeinflusst, bleibt noch zu klären (Stöckle et al. 2019).

5.4. Intrazellulärer Magnesiumgehalt und Magnesiumgehalt im Serum

In der Humanmedizin wurde gezeigt, dass bei Diabetes Mellitus Patienten meist ein Magnesiummangel auf zellulärer Ebene oder im Serum vorliegt (Barbagallo und Dominguez 2015). Außerdem wird in der Humanmedizin davon gesprochen, dass ein Typ 2 Diabetes Mellitus durch ein Magnesium Defizit hervorgerufen werden kann (Pham et al. 2007, Sales et al. 2011). In unserer Studie konnte nur bei 2 Pferden ein Magnesiummangel auf intrazellulärer Ebene festgestellt werden. Dies könnte damit zusammenhängen, dass das Pferd durch die Nahrungsaufnahme konstant gut mit Magnesium versorgt ist und somit der Bedarf an Magnesium gedeckt ist. Bei einer zusätzlichen oralen Supplementierung von Magnesium könnte man die Hypothese aufstellen, dass Magnesium vermehrt über den Urin ausgeschieden wird. Allerdings wurde in einer Studie von Stöckle et al. gezeigt, dass bei gesunden Pferden, die mit Magnesium gefüttert wurden, die Exkretion über den Urin nicht vermehrt ist (Stöckle et al. 2019).

Der Serum-Magnesiumgehalt lag bei allen Pferden im Referenzbereich. Dies unterstützt die Annahme, dass der Serum-Magnesiumgehalt relativ konstant gehalten wird und zunächst bei einem Mangel Magnesium aus den Zellen mobilisiert wird (Vormann 2003).

Humanmedizinische Studien zeigten, dass eine Magnesiumsupplementierung zu einer Verminderung der Inzidenz eines Diabetes Mellitus Typ 2 führt (Barbagallo und Dominguez 2015). Außerdem wurde in einer Studie von Kurth ein Anstieg der intrazellulären Magnesiumkonzentration durch orale Magnesiumsupplementierung bewirkt (Kurth 2012). Untersuchungen am Pferd zeigten keine signifikante Verbesserung der Insulinsensitivität nach Magnesiumsupplementierung (Chameroy et al. 2011, Winter et al. 2016). Auch in unserer Studie verbesserte sich die Insulinresistenz nicht. Außerdem konnte nach dreimonatiger Magnesiumsupplementierung keine erhöhte intrazelluläre Magnesiumkonzentration nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Pferde ausreichend mit Magnesium versorgt waren und das zusätzliche Magnesium ausgeschieden haben. Hier wäre es vorteilhaft gewesen, auch die Ausscheidung zu untersuchen. Aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes unserer Studie wurde dies jedoch nicht zusätzlich untersucht.

In der univariablen Regressionsanalyse konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der intrazellulären Magnesiumkonzentration nach der Placebo-Gabe zur Glukosekurve, RISQI, Nüchtern-Insulin und Fruktosamin festgestellt werden. Der grenzwertige Zusammenhang ($p=0,07$) zwischen der intrazellulären Magnesiumkonzentration und der Nüchtern-Insulin-Konzentration spricht dafür, dass mit zunehmender Insulinresistenz der intrazelluläre Magnesiumgehalt steigt. Der beobachtete Zusammenhang ($p=0,045$) zwischen der intrazellulären Magnesiumkonzentration und RISQI bestätigt dies. Der intrazelluläre Magnesiumgehalt sank, wenn RISQI anstieg und somit die Insulinsensitivität verbessert war. Dies widerspricht den bisher vermuteten Zusammenhänge.

In der multivariablen Regressionsanalyse wurde gezeigt, dass nur Fruktosamine und das Ergebnis des cGITs mit dem intrazellulären Magnesium signifikant nach der Placebo-Applikation assoziiert waren. Die anderen Faktoren hatten keinen Einfluss. RISQI konnte in die multivariable Regressionsanalyse nicht mit einbezogen werden, da dieser errechnete Wert zu stark mit Insulin korreliert. In der multivariablen Regressionsanalyse wurde gezeigt, dass, wenn der cGIT um den Faktor 1 anstieg, Magnesium intrazellulär um 0,001 mmol/l stieg. Das heißt: Je länger die Zeit bis zum Wiedererreichen des Glukosebasalwertes (und damit je schlechter die Insulinsensitivität ist), desto höher ist die intrazelluläre Magnesiumkonzentration. In der Verum-Gruppe hatten sich keine signifikanten Zusammenhänge gezeigt. Dies ist entgegen der bisherigen Annahme, dass die Magnesium-Aufnahme nach intrazellulär, wie beim Menschen ein Insulin-Rezeptor vermittelter Prozess ist

(Hwang et al. 1993, Kurth 2012). Die Zusammenhänge, die in der Placebo-Gruppe festgestellt wurden, sind vermutlich keine kausalen Zusammenhänge, sondern zufällig. Die Fruktosamine spiegeln den mittelfristigen Glukosegehalt wider. Abhängig von der Höhe des Blutzuckerspiegels werden Plasmaproteine gebildet. Bei Rehepferden wurde Fruktosamin als klinischer Marker für eine abnormale Glukosekontrolle identifiziert (Knowles et al. 2012). In dieser Studie wurde eine Assoziation zwischen Magnesium intrazellulär und dem Fruktosamingehalt in der Placebo-Gruppe festgestellt. Wenn Fruktosamin um den Faktor 1 anstieg, dann stieg Magnesium intrazellulär um 0,002 mmol/l an. Dieser Zusammenhang konnte in der Verum-Gruppe nicht festgestellt werden. Dies widerspricht den Erwartungen. Vermutlich ist auch hier der Zusammenhang zwischen Fruktosamin und dem intrazellulären Magnesium in der Placebo-Gruppe ein zufälliger und nicht kausaler Zusammenhang.

5.5. Hyperinsulinämie

Eine basale Hyperinsulinämie konnte in keinem der Fälle bestätigt werden. Die Nüchtern-Insulinkonzentrationen lagen alle innerhalb des Referenzbereiches. Das Insulin unterliegt weniger Schwankungen und ist ein eindeutigeres Indiz für eine Insulinresistenz (Brojer et al. 2013). Das Ausmaß der Insulinresistenz/-dysregulation war in der gesamten Studienpopulation nicht besonders ausgeprägt. Mit einer grenzwertigen Signifikanz ($p=0,07$) wurde ein linearer Zusammenhang zwischen dem basalen Insulin und der intrazellulären Magnesiumkonzentration in der Placebo-Gruppe gezeigt. Wenn die Nüchtern-Insulinkonzentration um den Faktor 1 stieg, dann stieg Magnesium intrazellulär um 0,005 mmol/l. Dies würde bedeuten, dass mit zunehmender Insulinresistenz die intrazelluläre Magnesiumkonzentration steigt und den bisherigen Beobachtungen und Annahmen widersprechen.

Die Ergebnisse zeigten, dass in der Placebo-Gruppe das stimulierte Insulin nach der Verabreichung im Mittel (20,5 $\mu\text{U/ml}$) niedriger war als in der Verum-Gruppe. Passend hierzu zeigte sich RISQI nachher höher als vorher. Dies spricht dafür, dass die Insulinsensitivität verbessert scheint. Vermutlich spielen hier andere Faktoren in das Ergebnis mit ein, so z.B. die Fütterung. In der Verum-Gruppe wurde berichtet, dass die Pferde oft mit schmackhaftem Müsli zugefüttert werden mussten, um eine Aufnahme des Verum-Präparates ansatzweise zu gewährleisten. In diesem Zusammenhang muss auch erwähnt werden, dass sich die stimulierten Insulin-Werte nach 45 Minuten signifikant zwischen den Gruppen vor der Verum-/Placebo-Applikation unterschieden. Insgesamt war die Konzentration in der Placebo-Gruppe zu Anfang signifikant höher und insgesamt zeigten 5 Pferde erhöhte stimulierte Insulin Werte.

Die Nüchtern-Insulinkonzentrationen lagen bei allen Pferden in der Norm. Die Verbesserung der Placebo-Gruppe ist in diesem Zusammenhang vermutlich durch andere Faktoren ausgelöst worden z.B. die Sensibilisierung der Besitzer, eine unbewusste Optimierung der Haltung und Bewegung. Die Zuteilung in die Gruppen war zufällig und nicht beeinflussbar.

5.6. Darreichungsform des Magnesiumaspartat-Hydrochlorids

In der Humanmedizin wurde ein signifikant positiver Effekt der oralen Magnesiumsupplementierung festgestellt. Da beim Menschen häufig ein Magnesiumdefizit diagnostiziert wird, entweder im Blut und/oder intrazellulär (Barbagallo und Dominguez 2007), wurde dieser Ansatz von Kurth in einer Studie untersucht. Hier wurde ein signifikanter Anstieg der intrazellulären Magnesiumkonzentration durch die orale Supplementierung von Magnesiumcitrat gezeigt (Kurth 2012). In unserer Studie konnte kein signifikanter Anstieg des intrazellulären Magnesiums festgestellt werden. Vor der Supplementierung zeigten lediglich 2 Pferde einen leichten intrazellulären Magnesiummangel. Diese Pferde waren in der Verum-Gruppe. In der Nachuntersuchung hatten insgesamt 5 Pferde einen verminderten intrazellulären Magnesiumgehalt, wovon sich 4 Pferde in der Placebo-Gruppe befanden. Dass 4 Pferde in der Placebo-Gruppe einen intrazellulären Magnesiummangel zeigten, könnte damit zusammenhängen, dass diesen nicht zusätzlich Magnesium zugeführt wurde und hier vermutlich Magnesium aus der Zelle mobilisiert wurde, um den Magnesiumhaushalt aufrecht zu erhalten. Hier wäre eine Messung des insgesamt mit der Nahrung aufgenommenen Magnesiums hilfreich gewesen. Es scheint unwahrscheinlich, dass die Pferde unzureichend über die Nahrung mit Magnesium versorgt wurden, insbesondere, da keines der Tiere eine spezielle Diät erhielt.

Die in der Studie von Kurth in der Humanmedizin festgestellte Erhöhung der intrazellulären Magnesiumkonzentration konnte in dem von uns durchgeführten Projekt am Pferd nicht bestätigt werden.

Mühlbauer et al. haben die Absorption verschiedener Magnesiumdarreichungsformen beim Menschen untersucht und konnten eine bessere Absorption von Magnesium-L-aspartat-Hydrochlorid zeigen im Vergleich zu Magnesiumoxid (Mühlbauer et al. 1991). Es gibt keine vergleichbaren Studien beim Pferd, sodass die Absorption beim Pferd sich möglicherweise anders verhält.

Die in unserer Studie verwendete Magnesiumaspartat-Hydrochlorid Lösung wurde mäßig toleriert. Ob dies an dem Geschmack, der Konsistenz oder der Menge der zu verabreichenden

Lösung lag, können wir nicht sagen. Die Pferde bekamen relativ große Mengen verabreicht. Das durchschnittliche Gewicht der Pferde betrug 431 kg, sodass die Pferde pro Tag etwa 200 ml der Lösung verabreicht bekommen mussten. Auch wenn die Besitzer eine regelmäßige Verabreichung bestätigten, musste die Lösung oft mit zusätzlichem Futter vermischt werden, um die Akzeptanz zu verbessern. Bei der alternativen oralen Verabreichung mit einer Spritze kam es laut Besitzern zu Verlusten. Außerdem wurden aus der Verum-Gruppe aufgrund von Nichtakzeptanz 3 Pferde nicht zur Nachuntersuchung vorgestellt. Von Studien in der Humanmedizin ist bekannt, dass das Magnesiumaspartat-Hydrochlorid wenig schmackhaft ist und daher bevorzugt in Tablettenform angewendet wird (Muhlbauer et al. 1991).

5.7. Compliance der Besitzer und Haltungsbedingungen

Die Teilnahme an der Studie setzte u.a. einen positiven cGIT voraus. In der 3-monatigen Phase der Verum- und Placebo-Fütterung sollte am Management der Tiere nichts geändert werden. Die Studie war auf eine zuverlässige Gabe der Präparate durch die Besitzer angewiesen. Einen negativen Einfluss könnte die Sensibilisierung der Besitzer durch einen positiv ausgefallenen cGIT haben, die somit auf das Equine metabolische Syndrom aufmerksam geworden sind. Deshalb ist es möglich, dass unbewusst in der Haltung, Fütterung und im Bewegungsmanagement Änderungen vorgenommen wurden. Gegen diese Annahme spricht, dass es keine signifikanten Veränderungen im BCS, CNS und Gewicht gegeben hat.

Des Weiteren sind saisonale Haltungsunterschiede anzumerken. In der Sommersaison werden die meisten Pferde auf einer Weide gehalten, teils stundenweise, teils den ganzen Tag. Es ist also möglich, dass sich solche Haltungsveränderungen innerhalb der Testphase eingestellt haben. In unserer Studie ist dem durch die randomisierte Verteilung entgegengewirkt. Bei der Betrachtung unserer Daten fällt eine recht gleichmäßige Verteilung der Pferde im Hinblick auf die Gruppe und den Verabreichungszeitraum auf.

Der bei Diabetespatienten in der Humanmedizin häufig vorliegende intrazelluläre Magnesiummangel (Barbagallo und Dominguez 2007) konnte in unserer Studie so nicht nachvollzogen werden. Es lag lediglich bei 2 Pferden eine intrazelluläre Magnesiumkonzentration unterhalb des Referenzbereiches vor. Dies lässt sich vermutlich damit erklären, dass die Futtermittel für Pferde häufig reich an Magnesium sind. Stewart et al. zeigten 2004 in einer Studie, dass der Pferdenahrung gezielt Magnesium entzogen werden muss, um ein wirkliches Magnesium-Defizit zu erreichen (Stewart et al. 2004).

6. Zusammenfassung

Der Einfluss von Magnesiumaspartat-Hydrochlorid auf die Insulinsensitivität bei Pferden mit Equinem metabolischen Syndrom

Das Equine metabolische Syndrom ist eine der meistverbreiteten endokrinen Störungen und somit eines der wichtigsten Forschungsgebiete in der Inneren Medizin beim Pferd.

Das Equine metabolische Syndrom zeigt viele Parallelen zu dem Diabetes Mellitus Typ II beim Menschen. Menschen mit Diabetes Mellitus Typ II zeigen oft einen Magnesiummangel auf intrazellulärer Ebene, während die Konzentration im Serum im Referenzbereich liegt. Dieser intrazelluläre Magnesiummangel kann beim Menschen verschiedene Ursachen haben. Hierzu zählen vermehrte renale und gastrointestinale Verluste oder eine zu geringe Aufnahme von Magnesium über die Nahrung. Studien der Humanmedizin zeigen eine Verbesserung der Insulinsensitivität nach Magnesiumsupplementierung. Mithilfe einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe konnte ein Referenzbereich für das intrazelluläre Magnesium bei gesunden Pferden etabliert und gezeigt werden, dass die intrazelluläre Magnesiumkonzentration bei Pferden mit dem metabolischen Syndrom niedriger ist als bei gesunden Tieren. Studien, die einen Einfluss nach Magnesiumsupplementierung auf die Insulinsensitivität beim Pferd untersuchen, gibt es bisher nicht. Hauptziel unserer Studie war daher, den Einfluss der Magnesiumfütterung auf die Insulinsensitivität bei Pferden mit dem metabolischen Syndrom zu untersuchen.

In dieser Studie wurden 41 an EMS erkrankte Pferde (diagnostiziert durch einen positiven cGIT und phänotypische Merkmale) über 3 Monate einmal täglich mit 30 mg/kg KGW Magnesiumaspartat-Hydrochlorid oder einem Placebo-Präparat gefüttert. Die untersuchenden Tierärzte und Besitzer der Pferde wussten nicht, ob das Pferd das Verum- oder Placebo-Präparat erhielt. Es wurden die Nüchtern-Glukosekonzentration, Glukosekurve, Nüchtern-Insulinkonzentration, stimulierte Insulinkonzentration, ACTH, Fruktosamine, Triglyzeride, GGT, die Magnesiumkonzentration im Serum sowie die intrazelluläre Magnesiumkonzentration gemessen. Außerdem wurden die Proxies RISQI (reciprocal inverse square of insulin) und MIRG (modified insulin-to-glucose ratio) berechnet. Mittels uni- und multivariabler linearer Regressionsanalyse wurde der Einfluss von intrazellulärem Magnesium auf die anderen erhobenen Parameter ermittelt. Ob es signifikante Unterschiede zwischen der Erst- und Nachuntersuchung (*Differenz_{vorher-nachher}*) gab wurde mittels „One-Sample Wilcoxon Signed Rank Test“ einmal für alle Daten und einmal getrennt für jede Gruppe durchgeführt.

Pferde in der Verum-Gruppe zeigten keine signifikante Verbesserung des cGITs (definiert als kürzere Zeit bis zum Wiedererreichen des Glukosebasalwertes) und der Insulinkonzentration zu den Zeitpunkten 0 und 45 Minuten. Es konnte weder in der Verum- noch in der Placebo-Gruppe ein signifikanter Unterschied im BCS, CNS und Körpergewicht in der Vor- und Nachuntersuchung gezeigt werden. Die Pferde in der Placebo-Gruppe zeigten eine signifikante Verringerung des stimulierten Insulins ($p=0,006$) und einen signifikanten Anstieg von RISQI ($p=0,042$).

Einige Einflussfaktoren und Limitationen dieser Studie sollten erwähnt sein: Die Futtermittel für Pferde zeigen normalerweise einen hohen Gehalt an Magnesium, sodass die Versorgung über die Nahrung zumeist gewährleistet ist. Auch die Verluste über den Urin verursacht durch eine Hyperglykämie und nachfolgende Glukosurie können beim Pferd vernachlässigt werden. In unserer Studie zeigte keines der Pferde eine Hyperglykämie. Zudem war die orale Akzeptanz des Magnesiumaspartat-Hydrochlorids sehr gering. Es ist möglich, dass die Menge und die Darreichungsform die Ergebnisse beeinflusst haben. Dies können Gründe dafür sein, dass der Effekt der Magnesiumsupplementierung in dieser Studie ausblieb.

In der Humanmedizin basiert die Diagnose eines Diabetes Mellitus Typ II auf einer basalen Hyperglykämie und Hyperinsulinämie. Hauptkriterium für die Bewertung der Insulinsensitivität beim Pferd sind die Glukosekurve und die Insulinantwort während des cGITs. Die Ausprägung der Insulindysregulation ist damit beim Menschen mit Diabetes deutlich stärker als bei Pferden mit Equinem metabolischen Syndrom. So waren die basalen oder stimulierten Insulinkonzentrationen in dieser Studie bei nur 7/41 Pferden bei der Erstuntersuchung erhöht. In den anderen Fällen wurde EMS basierend auf der Glukosedynamik diagnostiziert. Die Glukosedynamik unterliegt vielen externen Einflüssen und ist schlecht reproduzierbar. Weitere Studien sollten nur die Pferde einbeziehen, die eine schwere Form von EMS und eine erhöhte Insulinkonzentration (Nüchtern-Insulin/ Insulin nach 45 Minuten) zeigen, um die Rolle des Magnesiums bei diesen Patienten evaluieren zu können.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine Magnesiumsupplementierung bei den EMS Patienten in dieser Studie keine positiven Effekte auf die Insulinsensitivität hatte. Es benötigt weitere Studien, um die Rolle des Magnesiumstoffwechsels bei Pferden mit einer stärker ausgeprägten Insulindysregulation zu verstehen.

7. Summary

The influence of magnesium aspartate-hydrochloride on insulin sensitivity in horses with equine metabolic syndrome

The equine metabolic syndrome (EMS) is one of the most common endocrine disorders and therefore one of the main research areas in equine internal medicine.

The equine metabolic syndrome has many parallels to the human diabetes mellitus type II. Humans with diabetes mellitus type II often show an intracellular magnesium deficit, while the serum magnesium concentration is within its reference ranges. Multiple reasons for magnesium deficits have been suggested in humans which includes urinary and gastrointestinal losses of magnesium or a diet with a low magnesium content. In human diabetes patients, the supplementation of magnesium improves the insulin sensitivity. In a previous study our research group established reference ranges for the intracellular magnesium concentration in healthy horses and was able to show mildly reduced concentrations in horses with metabolic syndrome. To the best of the authors' knowledge, studies regarding the effect of magnesium supplementation on insulin sensitivity do not exist in equine medicine so far. The aim of this study was therefore, to investigate the influence of an oral magnesium supplementation on insulin sensitivity in horses with EMS.

This study included 41 horses with equine metabolic syndrome (diagnosed by a positive combined glucose insulin tolerance test and an EMS phenotype). For three months, these horses either received once daily 30 mg/kg bodyweight magnesium aspartate-hydrochloride or a placebo. Both treating veterinarian and horse owner did not know if the horse received verum or placebo. The baseline glucose, glucose curve, baseline insulin, insulin after 45 minutes, ACTH, fructosamine, triglycerides, GGT, serum magnesium and the intracellular magnesium concentration were determined. Furthermore, the reciprocal inverse square of insulin (RISQI) and the modified insulin-to-glucose ratio (MIRG) were calculated. Linear regression analyses with uni- and multivariable models were calculated to evaluate the influence of the intracellular magnesium concentration on all other collected parameters. Determination of significant differences between the initial and the follow-up examination (*difference_{before-after}*) was calculated with One-Sample Wilcoxon Signed Rank Test for all data and separately for the groups.

Horses, that received magnesium aspartate-hydrochloride showed no significant improvement of cGIT and the insulin sensitivity. No significant differences of BCS, CNS and body weight

were observed in horses that received verum or placebo during first and the follow-up examination. Horses, that received placebo showed a significant decrease of insulin after 45 minutes ($p=0,006$) and increase of RISQI ($p=0,042$).

Several influencing factors and limitation of this study should be mentioned: First of all, the diet of horses typically contains high amounts of magnesium and urinary losses of magnesium caused by hyperglycemia are rarely seen. In our study none of the horses showed glucose concentration high enough to cause hyperglycemia. Furthermore, the oral acceptance of magnesium aspartate-hydrochloride in horses was low. It is therefore possible, that the dosage and dosage form influenced the results. These might be reasons for the absent effects of magnesium supplementation in our study.

In human medicine, diabetes mellitus type II diagnosis is based on a hyperglycemia at rest and a more pronounced insulin dysregulation than in horses with EMS. In contrast, the main parameter for the assessment of insulin sensitivity in horses are glucose curve and insulin response during cGIT. In this study, baseline insulin or insulin after 45 minutes were elevated only in 7/41 horses during the first examination, and the diagnosis of EMS was based on glucose dynamics in the other cases. Glucose dynamics, however, are easily influenced by different external factors and are difficult to reproduce. Further studies should include only horses with a more severe form of EMS and increased insulin concentrations (baseline insulin/insulin after 45 minutes) to investigate the role of magnesium metabolism in this group.

In conclusion, further studies are necessary to understand and improve the treatment of equine metabolic syndrome. The role of magnesium dynamics needs further investigation, especially in horses with marked insulin resistance.

8. Literaturverzeichnis

Alzaid, A. A., Dinneen, S. F., Moyer, T. P. and Rizza, R. A. (1995):

Effects of insulin on plasma magnesium in noninsulin-dependent diabetes mellitus: evidence for insulin resistance.

J Clin Endocrinol Metab 80: 1376-1381. DOI: 10.1210/jcem.80.4.7714113.

Asplin, K. E., Sillence, M. N., Pollitt, C. C. and McGowan, C. M. (2007):

Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies.

Vet J 174: 530-535. DOI: 10.1016/j.tvjl.2007.07.003.

Bamford, N. J., Baskerville, C. L., Harris, P. A. and Bailey, S. R. (2015):

Postprandial glucose, insulin, and glucagon-like peptide-1 responses of different equine breeds adapted to meals containing micronized maize.

Journal of Animal Science 93: 3377-3383. DOI: 10.2527/jas.2014-8736.

Bamford, N. J., Potter, S. J., Harris, P. A. and Bailey, S. R. (2014):

Breed differences in insulin sensitivity and insulinemic responses to oral glucose in horses and ponies of moderate body condition score.

Domestic Animal Endocrinology 47: 101-107. DOI: 10.1016/j.domaniend.2013.11.001.

Barbagallo, M. and Dominguez, L. J. (2007):

Magnesium metabolism in type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome and insulin resistance.

Arch Biochem Biophys 458: 40-47. DOI: 10.1016/j.abb.2006.05.007.

Barbagallo, M. and Dominguez, L. J. (2015):

Magnesium and type 2 diabetes.

World J Diabetes 6: 1152-1157. DOI: 10.4239/wjd.v6.i10.1152.

Barbagallo, M., Dominguez, L. J., Galioto, A., Ferlisi, A., Cani, C., Malfa, L., Pineo, A., Busardo, A. and Paolisso, G. (2003):

Role of magnesium in insulin action, diabetes and cardio-metabolic syndrome X.

Mol Aspects Med 24: 39-52.

Basso, L. E., Ubbink, J. B. and Delport, R. (2000):

Erythrocyte magnesium concentration as an index of magnesium status: a perspective from a magnesium supplementation study.

Clinica Chimica Acta 291: 1-8. DOI: Doi 10.1016/S0009-8981(99)00168-0.

Becvarova, I. and Buechner-Maxwell, V. (2012):

Feeding the foal for immediate and long-term health.

Equine Vet J Suppl: 149-156. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2011.00522.x.

Bergman, R. N., Prager, R., Volund, A. and Olefsky, J. M. (1987):

Equivalence of the Insulin Sensitivity Index in Man Derived by the Minimal Model Method and the Euglycemic Glucose Clamp.

Journal of Clinical Investigation 79: 790-800. DOI: Doi 10.1172/Jci112886.

Bertin, F. R. and Sojka-Kritchevsky, J. E. (2013):

Comparison of a 2-step insulin-response test to conventional insulin-sensitivity testing in horses.

Domestic Animal Endocrinology 44: 19-25. DOI: 10.1016/j.domaniend.2012.07.003.

Brojer, J., Lindase, S., Hedenskog, J., Alvarsson, K. and Nostell, K. (2013):

Repeatability of the combined glucose-insulin tolerance test and the effect of a stressor before testing in horses of 2 breeds.

J Vet Intern Med 27: 1543-1550. DOI: 10.1111/jvim.12172.

Bruce, K. D. and Hanson, M. A. (2010):

The developmental origins, mechanisms, and implications of metabolic syndrome.

J Nutr 140: 648-652. DOI: 10.3945/jn.109.111179.

Bruynsteen, L., Erkens, T., Peelman, L. J., Ducatelle, R., Janssens, G. P. J., Harris, P. A. and Hesta, M. (2013):

Expression of inflammation-related genes is associated with adipose tissue location in horses.

Bmc Veterinary Research 9. DOI: Unsp 24010.1186/1746-6148-9-240.

Burns, T. A. (2016):

Effects of Common Equine Endocrine Diseases on Reproduction.

Vet Clin North Am Equine Pract 32: 435-449. DOI: 10.1016/j.cveq.2016.07.005.

Burns, T. A., Geor, R. J., Mudge, M. C., McCutcheon, L. J., Hinchcliff, K. W. and Belknap, J. K. (2010):

Proinflammatory cytokine and chemokine gene expression profiles in subcutaneous and visceral adipose tissue depots of insulin-resistant and insulin-sensitive light breed horses.

J Vet Intern Med 24: 932-939. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2010.0551.x.

Caltabilota, T. J., Earl, L. R., Thompson, D. L., Jr., Clavier, S. E. and Mitcham, P. B. (2010):

Hyperleptinemia in mares and geldings: assessment of insulin sensitivity from glucose responses to insulin injection.

J Anim Sci 88: 2940-2949. DOI: 10.2527/jas.2010-2879.

Carter, R. A., Geor, R. J., Burton Stanier, W., Cubitt, T. A. and Harris, P. A. (2009):

Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies.

Vet J 179: 204-210. DOI: 10.1016/j.tvjl.2008.02.029.

Chameroy, K. A., Frank, N., Elliott, S. B. and Boston, R. C. (2011):

Effects of a supplement containing chromium and magnesium on morphometric measurements, resting glucose, insulin concentrations and insulin sensitivity in laminitic obese horses.

Equine Vet J 43: 494-499. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2010.00302.x.

Chao, E. C. (2014):

SGLT-2 Inhibitors: A New Mechanism for Glycemic Control.

Clin Diabetes 32: 4-11. DOI: 10.2337/diaclin.32.1.4.

Chaudhary, D. P., Sharma, R. and Bansal, D. D. (2010):

Implications of Magnesium Deficiency in Type 2 Diabetes: A Review.

Biological Trace Element Research 134: 119-129. DOI: 10.1007/s12011-009-8465-z.

Classen, H., Marquardt, P., Späth, M., et al. (1973):

Vergleichende tierexperimentelle Untersuchungen über die Resorption von Magnesium als Sulfat, Chlorid, Aspartat und Aspartat-Hydrochlorid aus dem Magen-Darm-Trakt.

Arzneim-Forsch/Drug Res 23: 267-271.

Council, N. R. (2007):

Nutrient Requirements of Horses: Sixth Revised Edition

6. Auflage, Washington DC, The National Academies Press, ISBN 978-0-309-48895-2

Cowan, J. A. (1995):

The Biological Chemistry of Magnesium.

1. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH, ISBN 978-0471185833

de Laat, M. A., McGowan, C. M., Sillence, M. N. and Pollitt, C. C. (2010):

Equine laminitis: induced by 48 h hyperinsulinaemia in Standardbred horses.

Equine Vet J 42: 129-135. DOI: 10.2746/042516409X475779.

de Laat, M. A., McGree, J. M. and Sillence, M. N. (2016):

Equine hyperinsulinemia: investigation of the enteroinsular axis during insulin dysregulation.

Am J Physiol Endocrinol Metab 310: E61-72. DOI: 10.1152/ajpendo.00362.2015.

DeFronzo, R. A., Tobin, J. D. and Andres, R. (1979):

Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance.

Am J Physiol 237: E214-223.

Delva, P., Pastori, C., Montesi, G., Degan, M., Micciolo, R., Paluani, F. and Lechi, A. (1998):

Intralymphocyte free magnesium and calcium and insulin tolerance test in a group of essential hypertensive patients.

Life Sci 63: 1405-1415. DOI: 10.1016/s0024-3205(98)00407-x.

Delva, P. T., Pastori, C., Degan, M., Montesi, G. D. and Lechi, A. (1996):

Intralymphocyte free magnesium in a group of subjects with essential hypertension.

Hypertension 28: 433-439. DOI: 10.1161/01.hyp.28.3.433.

Dibaba, D. T., Xun, P., Fly, A. D., Yokota, K. and He, K. (2014):

Dietary magnesium intake and risk of metabolic syndrome: a meta-analysis.

Diabet Med 31: 1301-1309. DOI: 10.1111/dme.12537.

DiCostanzo, C. A., Dardevet, D. P., Neal, D. W., Lutz, M., Allen, E., Snead, W. and Cherrington, A. D. (2006):

Role of the hepatic sympathetic nerves in the regulation of net hepatic glucose uptake and the mediation of the portal glucose signal.

American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 290: E9-E16. DOI: 10.1152/ajpendo.00184.2005.

Duehlmeier, R., Hacker, A., Widdel-Bigdely, A., von Engelhardt, W. and Sallmann, H. P. (2010):

Insulin stimulates GLUT4 translocation in the semitendinosus muscle of Shetland ponies.

Veterinary Journal 184: 176-181. DOI: 10.1016/j.tvjl.2009.01.024.

Duhlmeier, R., Deegen, E., Fuhrmann, H., Widdel, A. and Sallmann, H. P. (2001):

Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and the enteroinsular axis in equines (*Equus caballus*).

Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology 129: 563-575. DOI: 10.1016/S1095-6433(01)00295-1.

Dunbar, L. K., Mielnicki, K. A., Dembek, K. A., Toribio, R. E. and Burns, T. A. (2016):
Evaluation of Four Diagnostic Tests for Insulin Dysregulation in Adult Light-Breed Horses.
J Vet Intern Med 30: 885-891. DOI: 10.1111/jvim.13934.

Durham, A. E., Frank, N., McGowan, C. M., Menzies-Gow, N. J., Roelfsema, E., Vervuert, I.,
Feige, K. and Fey, K. (2019):
ECEIM consensus statement on equine metabolic syndrome.
J Vet Intern Med 33: 335-349. DOI: 10.1111/jvim.15423.

Durham, A. E., Hughes, K. J., Cottle, H. J., Rendle, D. I. and Boston, R. C. (2009):
Type 2 diabetes mellitus with pancreatic beta cell dysfunction in 3 horses confirmed with
minimal model analysis.
Equine Vet J 41: 924-929. DOI: 10.2746/042516409x452152.

Durham, A. E., Rendle, D. I. and Newton, J. E. (2008):
The effect of metformin on measurements of insulin sensitivity and beta cell response in 18
horses and ponies with insulin resistance.
Equine Vet J 40: 493-500. DOI: 10.2746/042516408X273648.

Dyer, J., Al-Rammahi, M., Waterfall, L., Salmon, K. S., Geor, R. J., Boure, L., Edwards, G.
B., Proudman, C. J. and Shirazi-Beechey, S. P. (2009):
Adaptive response of equine intestinal Na⁺/glucose co-transporter (SGLT1) to an increase in
dietary soluble carbohydrate.
Pflugers Arch 458: 419-430. DOI: 10.1007/s00424-008-0620-4.

Eiler, H., Frank, N., Andrews, F. M., Oliver, J. W. and Fecteau, K. A. (2005):
Physiologic assessment of blood glucose homeostasis via combined intravenous glucose
and insulin testing in horses.
Am J Vet Res 66: 1598-1604. DOI: 10.2460/ajvr.2005.66.1598.

Elin, R. J. and Hosseini, J. M. (1985):
Magnesium content of mononuclear blood cells.
Clin Chem 31: 377-380.

Elzinga, S. E., Rohleder, B., Schanbacher, B., McQuerry, K., Barker, V. D. and Adams, A. A.
(2017):
Metabolic and inflammatory responses to the common sweetener stevioside and a glycemic
challenge in horses with equine metabolic syndrome.
Domest Anim Endocrinol 60: 1-8. DOI: 10.1016/j.domaniend.2017.01.001.

Ertelt, A., Barton, A. K., Schmitz, R. R. and Gehlen, H. (2014):

Metabolic syndrome: is equine disease comparable to what we know in humans?

Endocr Connect 3: R81-93. DOI: 10.1530/EC-14-0038.

Faller, A. S., M., Schünke, G. (2004):

Der Körper des Menschen - Einführung in Bau und Funktion.

14. Auflage, Georg Thieme Verlag, ISBN 3-13-329714-7

Fitzgerald, D. M., Walsh, D. M., Sillence, M. N., Pollitt, C. C. and de Laat, M. A. (2019):

Insulin and incretin responses to grazing in insulin-dysregulated and healthy ponies.

J Vet Intern Med 33: 225-232. DOI: 10.1111/jvim.15363.

Frank, N. (2011):

Equine metabolic syndrome.

Vet Clin North Am Equine Pract 27: 73-92. DOI: 10.1016/j.cveq.2010.12.004.

Frank, N., Buchanan, B. R. and Elliott, S. B. (2008a):

Effects of long-term oral administration of levothyroxine sodium on serum thyroid hormone concentrations, clinicopathologic variables, and echocardiographic measurements in healthy adult horses.

Am J Vet Res 69: 68-75. DOI: 10.2460/ajvr.69.1.68.

Frank, N., Elliott, S. B. and Boston, R. C. (2008b):

Effects of long-term oral administration of levothyroxine sodium on glucose dynamics in healthy adult horses.

Am J Vet Res 69: 76-81. DOI: 10.2460/ajvr.69.1.76.

Frank, N., Geor, R. J., Bailey, S. R., Durham, A. E., Johnson, P. J. and American College of Veterinary Internal, M. (2010):

Equine metabolic syndrome.

J Vet Intern Med 24: 467-475. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2010.0503.x.

Frank, N., Sommardahl, C. S., Eiler, H., Webb, L. L., Denhart, J. W. and Boston, R. C. (2005):

Effects of oral administration of levothyroxine sodium on concentrations of plasma lipids, concentration and composition of very-low-density lipoproteins, and glucose dynamics in healthy adult mares.

Am J Vet Res 66: 1032-1038. DOI: 10.2460/ajvr.2005.66.1032.

Fulop, T., Tessier, D. and Carpentier, A. (2006):

The metabolic syndrome.

Pathol Biol (Paris) 54: 375-386. DOI: 10.1016/j.patbio.2006.07.002.

Funk, R. A., Wooldridge, A. A., Stewart, A. J., Behrend, E. N., Kemppainen, R. J., Zhong, Q. and Johnson, A. K. (2012):

Seasonal changes in the combined glucose-insulin tolerance test in normal aged horses.

J Vet Intern Med 26: 1035-1041. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2012.00939.x.

Geor, R. J. (2008):

Metabolic Predispositions to Laminitis in Horses and Ponies: Obesity, Insulin Resistance and Metabolic Syndromes.

Journal of Equine Veterinary Science 28: 753-759. DOI: 10.1016/j.jevs.2008.10.016.

Greisen, J., Juhl, C. B., Grofte, T., Vilstrup, H., Jensen, T. S. and Schmitz, O. (2001):

Acute pain induces insulin resistance in humans.

Anesthesiology 95: 578-584. DOI: 10.1097/00000542-200109000-00007.

Grob, A. J., Delarocque, J., Feige, K. and Warnken, T. (2020):

Einfluss zweier Insulinpräparate auf die Aussage des Insulinstimulationstests bei Pferden.

Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 48: V06. DOI: 10.1055/s-0039-3402381.

Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. (1985):

A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties.

J Biol Chem 260: 3440-3450. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)83641-4.

Gunther, T. (2010):

The biochemical function of Mg(2)+ in insulin secretion, insulin signal transduction and insulin resistance.

Magnes Res 23: 5-18. DOI: 10.1684/mrh.2009.0195.

Harrison, D. G. (1997):

Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction.

Journal of Clinical Investigation 100: 2153-2157. DOI: 10.1172/Jci119751.

Henneke, D. R., Potter, G. D., Kreider, J. L. and Yeates, B. F. (1983):

Relationship between Condition Score, Physical Measurements and Body-Fat Percentage in Mares.

Equine Veterinary Journal 15: 371-372. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1983.tb01826.x.

Henquin, J. C., Ishiyama, N., Nenquin, M., Ravier, M. A. and Jonas, J. C. (2002):
Signals and pools underlying biphasic insulin secretion.

Diabetes 51 Suppl 1: S60-67. DOI: 10.2337/diabetes.51.2007.s60.

Holbrook, T. C., Tipton, T. and McFarlane, D. (2012):

Neutrophil and cytokine dysregulation in hyperinsulinemic obese horses.

Vet Immunol Immunopathol 145: 283-289. DOI: 10.1016/j.vetimm.2011.11.013.

Hopkins, T. A., Ouchi, N., Shibata, R. and Walsh, K. (2007):

Adiponectin actions in the cardiovascular system.

Cardiovasc Res 74: 11-18. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.10.009.

Hotta, K., Funahashi, T., Bodkin, N. L., Ortmeyer, H. K., Arita, Y., Hansen, B. C. and Matsuzawa, Y. (2001):

Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys.

Diabetes 50: 1126-1133. DOI: 10.2337/diabetes.50.5.1126.

Houseknecht, K. L. and Portocarrero, C. P. (1998):

Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis.

Domest Anim Endocrinol 15: 457-475. DOI: 10.1016/s0739-7240(98)00035-6.

Hruby, A., Guasch-Ferre, M., Bhupathiraju, S. N., Manson, J. E., Willett, W. C., McKeown, N. M. and Hu, F. B. (2017):

Magnesium Intake, Quality of Carbohydrates, and Risk of Type 2 Diabetes: Results From Three US Cohorts.

Diabetes Care 40: 1695-1702. DOI: 10.2337/dc17-1143.

Hustace, J. L., Firshman, A. M. and Mata, J. E. (2009):

Pharmacokinetics and bioavailability of metformin in horses.

Am J Vet Res 70: 665-668. DOI: 10.2460/ajvr.70.5.665.

Hutley, L. and Prins, J. B. (2005):

Fat as an endocrine organ: Relationship to the metabolic syndrome.

American Journal of the Medical Sciences 330: 280-289. DOI: 10.1097/00000441-200512000-00005.

Hwang, D. L., Yen, C. F. and Nadler, J. L. (1993):

Insulin increases intracellular magnesium transport in human platelets.

J Clin Endocrinol Metab 76: 549-553. DOI: 10.1210/jcem.76.3.8445010.

Jansson, P. A. (2007):

Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 diabetes.

J Intern Med 262: 173-183. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2007.01830.x.

Johnson, P. J. (2002):

The equine metabolic syndrome peripheral Cushing's syndrome.

Vet Clin North Am Equine Pract 18: 271-293. DOI: 10.1016/s0749-0739(02)00006-8.

Johnson, P. J., Scotty, N. C., Wiedmeyer, C., Messer, N. T. and Kreeger, J. M. (2005):

Diabetes mellitus in a domesticated Spanish mustang.

J Am Vet Med Assoc 226: 584-588, 542. DOI: 10.2460/javma.2005.226.584.

Johnson, P. J., Wiedmeyer, C. E., LaCarrubba, A., Ganjam, V. K. and Messer, N. T. t. (2012):

Diabetes, insulin resistance, and metabolic syndrome in horses.

J Diabetes Sci Technol 6: 534-540. DOI: 10.1177/193229681200600307.

Kadowaki, T. and Yamauchi, T. (2005):

Adiponectin and adiponectin receptors.

Endocr Rev 26: 439-451. DOI: 10.1210/er.2005-0005.

Karim, S., Adams, D. H. and Lalor, P. F. (2012):

Hepatic expression and cellular distribution of the glucose transporter family.

World Journal of Gastroenterology 18: 6771-6781. DOI: 10.3748/wjg.v18.i46.6771.

Kearns, C. F., McKeever, K. H., Roegner, V., Brady, S. M. and Malinowski, K. (2006):

Adiponectin and leptin are related to fat mass in horses.

Vet J 172: 460-465. DOI: 10.1016/j.tvjl.2005.05.002.

Knowles, E. J., Withers, J. M. and Mair, T. S. (2012):

Increased plasma fructosamine concentrations in laminitic horses.

Equine Vet J 44: 226-229. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2011.00419.x.

Kronfeld, D. S., Treiber, K. H. and Geor, R. J. (2005):

Comparison of nonspecific indications and quantitative methods for the assessment of insulin resistance in horses and ponies.

J Am Vet Med Assoc 226: 712-719. DOI: 10.2460/javma.2005.226.712.

Kumeda, Y. and Inaba, M. (2005):

[Metabolic syndrome and magnesium].

Clin Calcium 15: 97-104. DOI: CliCa051118591866.

Kurth, K. (2012):

Validierung magnesiumsensitiver Gene als Biomarker für den intrazellulären Magnesiumstatus von Diabetes-mellitus-Typ-II Patienten

Mensch und Buch Verlag, ISBN 978-3-86387-321-9

Lacombe, V. A. (2014):

Expression and regulation of facilitative glucose transporters in equine insulin-sensitive tissue: from physiology to pathology.

ISRN Vet Sci 2014: 409547. DOI: 10.1155/2014/409547.

Lam, Q. L. and Lu, L. (2007):

Role of leptin in immunity.

Cell Mol Immunol 4: 1-13.

Legere, R. M., Taylor, D. R., Davis, J. L., Bello, K., Parker, C., Judd, R. L. and Wooldridge, A. A. (2019):

Pharmacodynamic Effects of Pioglitazone on High Molecular Weight Adiponectin Concentrations and Insulin Response After Oral Sugar in Equids.

J Equine Vet Sci 82: 102797. DOI: 10.1016/j.jevs.2019.102797.

Liburt, N., Fugaro, M., Wunderlich, E., Ivey, J., Horohov, D., Betancourt, A., Boston, R., McKeever, K. and Geor, R. (2011):

The effect of exercise training on insulin sensitivity and fat and muscle tissue cytokine profiles of old and young Standardbred mares.

Journal of Equine Veterinary Science - J EQUINE VET SCI 31: 237-238. DOI: 10.1016/j.jevs.2011.03.034.

Liebich, P. D. m. v. D. h. c. m. H.-G. (2003):

Funktionelle Histologie der Haussäugetiere.

4. Auflage, Schattauer, ISBN 3-7945-2311-3

Lindase, S., Nostell, K. and Brojer, J. (2016):

A modified oral sugar test for evaluation of insulin and glucose dynamics in horses.

Acta Vet Scand 58: 64. DOI: 10.1186/s13028-016-0246-z.

Lindase, S., Nostell, K., Soder, J. and Brojer, J. (2017):

Relationship Between beta-cell Response and Insulin Sensitivity in Horses based on the Oral Sugar Test and the Euglycemic Hyperinsulinemic Clamp.

J Vet Intern Med 31: 1541-1550. DOI: 10.1111/jvim.14799.

List, J. F., Woo, V., Morales, E., Tang, W. and Fiedorek, F. T. (2009):

Sodium-glucose cotransport inhibition with dapagliflozin in type 2 diabetes.

Diabetes Care 32: 650-657. DOI: 10.2337/dc08-1863.

Lyon, C. J., Law, R. E. and Hsueh, W. A. (2003):

Minireview: Adiposity, inflammation, and atherogenesis.

Endocrinology 144: 2195-2200. DOI: 10.1210/en.2003-0285.

Manteiga, S., Choi, K., Jayaraman, A. and Lee, K. (2013):

Systems biology of adipose tissue metabolism: regulation of growth, signaling and inflammation.

Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med 5: 425-447. DOI: 10.1002/wsbm.1213.

Marks, V., Morgan, L., Oben, J. and Elliott, R. (1991):

Gut hormones in glucose homeostasis.

Proc Nutr Soc 50: 545-552. DOI: 10.1079/pns19910067.

Mather, K. J., Lteif, A., Steinberg, H. O. and Baron, A. D. (2004):

Interactions between endothelin and nitric oxide in the regulation of vascular tone in obesity and diabetes.

Diabetes 53: 2060-2066. DOI: DOI 10.2337/diabetes.53.8.2060.

McFarlane, D. (2011):

Equine pituitary pars intermedia dysfunction.

Vet Clin North Am Equine Pract 27: 93-113. DOI: 10.1016/j.cveq.2010.12.007.

McGowan, C. M., Dugdale, A. H., Pinchbeck, G. L. and Argo, C. M. (2013):

Dietary restriction in combination with a nutraceutical supplement for the management of equine metabolic syndrome in horses.

Vet J 196: 153-159. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.10.007.

Meier, A., de Laat, M., Pollitt, C., Walsh, D., McGree, J., Reiche, D. B., von Salis-Soglio, M., Wells-Smith, L., Mengeler, U., Mesa Salas, D., Droegemueller, S. and Sillence, M. N. (2019):

A "modified Obel" method for the severity scoring of (endocrinopathic) equine laminitis.

PeerJ 7: e7084. DOI: 10.7717/peerj.7084.

Meier, A., de Laat, M., Reiche D., Fitzgerald D., Sillence M. (2019):

The efficacy and safety of velagliflozin over 16 weeks as a treatment for insulin dysregulation in ponies.

Bmc Veterinary Research. DOI: 10.1186/s12917-019-1811-2.

Meier, A., Reiche, D., de Laat, M., Pollitt, C., Walsh, D. and Sillence, M. (2018):

The sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor velagliflozin reduces hyperinsulinemia and prevents laminitis in insulin-dysregulated ponies.

PLoS One 13: e0203655. DOI: 10.1371/journal.pone.0203655.

Morgan, L. M. (1998):

The role of gastrointestinal hormones in carbohydrate and lipid metabolism and homeostasis: effects of gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1.

Biochem Soc Trans 26: 216-222. DOI: 10.1042/bst0260216.

Morgan, R., Keen, J. and McGowan, C. (2015):

Equine metabolic syndrome.

Vet Rec 177: 173-179. DOI: 10.1136/vr.103226.

Morgan, R. A., Keen, J. A. and McGowan, C. M. (2016):

Treatment of equine metabolic syndrome: A clinical case series.

Equine Vet J 48: 422-426. DOI: 10.1111/evj.12445.

Morgan, R. A., McGowan, T. W. and McGowan, C. M. (2014):

Prevalence and risk factors for hyperinsulinaemia in ponies in Queensland, Australia.

Aust Vet J 92: 101-106. DOI: 10.1111/avj.12159.

Mueckler, M. (1994):

Facilitative Glucose Transporters.

European Journal of Biochemistry 219: 713-725. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18550.x.

Muhlbauer, B., Schwenk, M., Coram, W. M., Antonin, K. H., Etienne, P., Bieck, P. R. and Douglas, F. L. (1991):

Magnesium-L-aspartate-HCl and magnesium-oxide: bioavailability in healthy volunteers.
Eur J Clin Pharmacol 40: 437-438. DOI: 10.1007/BF00265863.

Muniyappa, R., Lee, S., Chen, H. and Quon, M. J. (2008):

Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage.

Am J Physiol Endocrinol Metab 294: E15-26. DOI: 10.1152/ajpendo.00645.2007.

Muniyappa, R., Montagnani, M., Koh, K. K. and Quon, M. J. (2007):

Cardiovascular actions of insulin.

Endocrine Reviews 28: 463-491. DOI: 10.1210/er.2007-0006.

Muno, J. D. (2009):

Prevalence, risk factors and seasonality of plasma insulin concentrations in normal horses in central ohio

The Ohio State University.

Nadler, J. L. and Rude, R. K. (1995):

Disorders of magnesium metabolism.

Endocrinol Metab Clin North Am 24: 623-641. DOI: 10.1016/S0889-8529(18)30035-5.

Orth, D. N., Holscher, M. A., Wilson, M. G., Nicholson, W. E., Plue, R. E. and Mount, C. D. (1982):

Equine Cushing's disease: plasma immunoreactive proopiomelanocortin peptide and cortisol levels basally and in response to diagnostic tests.

Endocrinology 110: 1430-1441. DOI: 10.1210/endo-110-4-1430.

Pham, P. C., Pham, P. M., Pham, S. V., Miller, J. M. and Pham, P. T. (2007):

Hypomagnesemia in patients with type 2 diabetes.

Clin J Am Soc Nephrol 2: 366-373. DOI: 10.2215/CJN.02960906.

Ponder, S. W., Brouhard, B. H. and Travis, L. B. (1990):

Hyperphosphaturia and hypermagnesuria in children with IDDM.

Diabetes Care 13: 437-441. DOI: 10.2337/diacare.13.4.437.

Pratt, S. E., Geor, R. J. and McCutcheon, L. J. (2005):

Repeatability of 2 methods for assessment of insulin sensitivity and glucose dynamics in horses.

J Vet Intern Med 19: 883-888. DOI: 10.1892/0891-6640(2005)19[883:romfao]2.0.co;2.

Radin, M. J., Sharkey, L. C. and Holycross, B. J. (2009):

Adipokines: a review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats, and horses.

Vet Clin Pathol 38: 136-156. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2009.00133.x.

Ralston, S. L. (2002):

Insulin and glucose regulation.

Vet Clin North Am Equine Pract 18: 295-304, vii. DOI: 10.1016/s0749-0739(02)00014-7.

Rapson, J. L., Schott, H. C., 2nd, Nielsen, B. D., McCutcheon, L. J., Harris, P. A. and Geor, R. J. (2018):

Effects of age and diet on glucose and insulin dynamics in the horse.

Equine Vet J 50: 690-696. DOI: 10.1111/evj.12812.

Rask-Madsen, C. and King, G. L. (2007):

Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes.

Nat Clin Pract Endocrinol Metab 3: 46-56. DOI: 10.1038/ncpendmet0366.

Rasouli, N. and Kern, P. A. (2008):

Adipocytokines and the metabolic complications of obesity.

J Clin Endocrinol Metab 93: S64-73. DOI: 10.1210/jc.2008-1613.

Reed, S. M., Bayly W.M., Sellon D.C. (2018):

Equine Internal Medicine

4. Auflage, ELSEVIER, ISBN 978-0-323-44329-6

Rorsman, P. and Braun, M. (2013):

Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets.

Annu Rev Physiol 75: 155-179. DOI: 10.1146/annurev-physiol-030212-183754.

Sales, C. H., Pedrosa, L. F., Lima, J. G., Lemos, T. M. and Colli, C. (2011):

Influence of magnesium status and magnesium intake on the blood glucose control in patients with type 2 diabetes.

Clin Nutr 30: 359-364. DOI: 10.1016/j.clnu.2010.12.011.

Samuel, V. T., Petersen, K. F. and Shulman, G. I. (2010):

Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism.

Lancet 375: 2267-2277. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60408-4.

Saris, N. E., Mervaala, E., Karppanen, H., Khawaja, J. A. and Lewenstam, A. (2000):
Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects.

Clin Chim Acta 294: 1-26. DOI: 10.1016/s0009-8981(99)00258-2.

Schott, H. C., 2nd (2002):

Pituitary pars intermedia dysfunction: equine Cushing's disease.

Vet Clin North Am Equine Pract 18: 237-270. DOI: 10.1016/s0749-0739(02)00018-4.

Schuver, A., Frank, N., Chameroy, K. A. and Elliott, S. B. (2014):

Assessment of Insulin and Glucose Dynamics by Using an Oral Sugar Test in Horses.

Journal of Equine Veterinary Science 34: 465-470. DOI: 10.1016/j.jevs.2013.09.006.

Schwelger, J. S., Lucius, Runhild (2016):

Der Mensch - Anatomie und Physiologie.

6. Auflage, Thieme, ISBN 978-3-13-100156-6

Shirazi-Beechey, S. P., Moran, A. W., Batchelor, D. J., Daly, K. and Al-Rammahi, M. (2011):

Glucose sensing and signalling; regulation of intestinal glucose transport.

Proc Nutr Soc 70: 185-193. DOI: 10.1017/S0029665111000103.

Silbernagel, S., Despopoulos, A. (2007):

Taschenatlas Physiologie.

7. Auflage, Georg Thieme Verlag KG, ISBN 978-3-13-567707-1

Smith, S., Harris, P. A. and Menzies-Gow, N. J. (2016):

Comparison of the in-feed glucose test and the oral sugar test.

Equine Vet J 48: 224-227. DOI: 10.1111/evj.12413.

Stephenson, H. M., Green, M. J. and Freeman, S. L. (2011):

Prevalence of obesity in a population of horses in the UK.

Vet Rec 168: 131. DOI: 10.1136/vr.c6281.

Stewart, A. J., Hardy, J., Kohn, C. W., Toribio, R. E., Hinchcliff, K. W. and Silver, B. (2004):

Validation of diagnostic tests for determination of magnesium status in horses with reduced magnesium intake.

American Journal of Veterinary Research 65: 422-430. DOI: 10.2460/ajvr.2004.65.422.

Stöckle, S., Müller, E., Winter, J., Sponder, G., Aschenbach, J., Pieper, L. and Gehlen, H. (2019):

Dose-dependent effects of magnesium supplementation on serum and intracellular magnesium concentrations in healthy horses.

Pferdeheilkunde Equine Medicine 35: 529–536. DOI: 10.21836/PEM20190605.

Suzuki, M., Takamisawa, I., Yoshimasa, Y. and Harano, Y. (2007):

Association between insulin resistance and endothelial dysfunction in type 2 diabetes and the effects of pioglitazone.

Diabetes Res Clin Pract 76: 12-17. DOI: 10.1016/j.diabres.2006.07.033.

Tinworth, K. D., Boston, R. C., Harris, P. A., Sillence, M. N., Raidal, S. L. and Noble, G. K. (2012):

The effect of oral metformin on insulin sensitivity in insulin-resistant ponies.

Vet J 191: 79-84. DOI: 10.1016/j.tvjl.2011.01.015.

Tinworth, K. D., Edwards, S., Noble, G. K., Harris, P. A., Sillence, M. N. and Hackett, L. P. (2010a):

Pharmacokinetics of metformin after enteral administration in insulin-resistant ponies.

Am J Vet Res 71: 1201-1206. DOI: 10.2460/ajvr.71.10.1201.

Tinworth, K. D., Harris, P. A., Sillence, M. N. and Noble, G. K. (2010b):

Potential treatments for insulin resistance in the horse: A comparative multi-species review.

Veterinary Journal 186: 282-291. DOI: 10.1016/j.tvjl.2009.08.032.

Tok, D., Ozcan, F., Kadife, I., Turak, O., Cagh, K., Basar, N., Golbasi, Z. and Aydogdu, S. (2013):

Impaired coronary flow reserve evaluated by echocardiography is associated with increased aortic stiffness in patients with metabolic syndrome: an observational study.

Anadolu Kardiyoloji Dergisi-the Anatolian Journal of Cardiology 13: 227-234. DOI: 10.5152/akd.2013.068.

Toth, F., Frank, N., Elliott, S. B., Perdue, K., Geor, R. J. and Boston, R. C. (2009):

Optimisation of the frequently sampled intravenous glucose tolerance test to reduce urinary glucose spilling in horses.

Equine Vet J 41: 844-851. DOI: 10.2746/042516409x439661.

Treiber, K. H., Kronfeld, D. S., Hess, T. M., Boston, R. C. and Harris, P. A. (2005):

Use of proxies and reference quintiles obtained from minimal model analysis for determination of insulin sensitivity and pancreatic beta-cell responsiveness in horses.

Am J Vet Res 66: 2114-2121. DOI: 10.2460/ajvr.2005.66.2114.

Treiber, K. H., Kronfeld, D. S., Hess, T. M., Byrd, B. M., Splan, R. K. and Staniar, W. B. (2006):

Evaluation of genetic and metabolic predispositions and nutritional risk factors for pasture-associated laminitis in ponies.

J Am Vet Med Assoc 228: 1538-1545. DOI: 10.2460/javma.228.10.1538.

Vick, M. M., Adams, A. A., Murphy, B. A., Sessions, D. R., Horohov, D. W., Cook, R. F., Shelton, B. J. and Fitzgerald, B. P. (2007):

Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse.

Journal of Animal Science 85: 1144-1155. DOI: 10.2527/jas.2006-673.

Vormann, J. (2003):

Magnesium: nutrition and metabolism.

Mol Aspects Med 24: 27-37. DOI: 10.1016/s0098-2997(02)00089-4.

Waller, A. P., Burns, T. A., Mudge, M. C., Belknap, J. K. and Lacombe, V. A. (2011):

Insulin Resistance Selectively Alters Cell-Surface Glucose Transporters but not their Total Protein Expression in Equine Skeletal Muscle.

Journal of Veterinary Internal Medicine 25: 315-321. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2010.0674.x.

Walser, M. (1967):

Magnesium metabolism.

Ergeb Physiol 59: 185-296. DOI: 10.1007/BF02269144.

Walsh, D. M., McGowan, C. M., McGowan, T., Lamb, S. V., Schanbacher, B. J. and Place, N. J. (2009):

Correlation of Plasma Insulin Concentration with Laminitis Score in a Field Study of Equine Cushing's Disease and Equine Metabolic Syndrome.

Journal of Equine Veterinary Science 29: 87-94. DOI: 10.1016/j.jevs.2008.12.006.

Warnken, T., Delarocque, J., Schumacher, S., Huber, K. and Feige, K. (2018a):

Retrospective analysis of insulin responses to standard dosed oral glucose tests (OGTs) via naso-gastric tubing towards definition of an objective cut-off value.

Acta Vet Scand 60: 4. DOI: 10.1186/s13028-018-0358-8.

Warnken, T., Huber, K. and Feige, K. (2016):

Comparison of three different methods for the quantification of equine insulin.

BMC Vet Res 12: 196. DOI: 10.1186/s12917-016-0828-z.

Warnken, T., Reiche, D., Huber, K. and Feige, K. (2018b):

Comparison of endocrine and metabolic responses to oral glucose test and combined glucose-insulin tests in horses.

Pferdeheilkunde 34: 316-325. DOI: 10.21836/Pem20180401.

Wearn, J. G., Suagee, J. K., Crisman, M. V., Corl, B. A., Hulver, M. W., Hodgson, D. R., Geor, R. J. and McCutcheon, L. J. (2012):

Effects of the insulin sensitizing drug, pioglitazone, and lipopolysaccharide administration on markers of systemic inflammation and clinical parameters in horses.

Vet Immunol Immunopathol 145: 42-49. DOI: 10.1016/j.vetimm.2011.10.007.

Widmer, J., Feray, J. C., Bovier, P., Hilleret, H., Raffin, Y., Chollet, D., Gaillard, J. M. and Garay, R. (1995):

Sodium-Magnesium Exchange in Erythrocyte-Membranes from Patients with Affective-Disorders.

Neuropsychobiology 32: 13-18. DOI: 10.1159/000119206.

Willson, T. M., Lambert, M. H. and Kliewer, S. A. (2001):

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease.

Annu Rev Biochem 70: 341-367. DOI: 10.1146/annurev.biochem.70.1.341.

Winter, J. C., Liertz, S., Merle, R., Aschenbach, J. R. and Gehlen, H. (2016):

Orale Supplementierung von Magnesiumaspartat-hydrochlorid bei Pferden mit Equinem Metabolischem Syndrom.

Pferdeheilkunde 32 (4): 372-377. DOI: 10.21836/PEM20160410.

Winter, J. C., Müller, E., Sponder, G., Merle, R., Aschenbach, J. R. and Gehlen, H. (2020):

Relationship between intracellular free magnesium concentration and the degree of insulin resistance in horses with equine metabolic syndrome.

Pferdeheilkunde 36 (4): 325–332. DOI: 10.21836/PEM20200406.

Winter, J. C., Sponder, G., Merle, R., Aschenbach, J. R. and Gehlen, H. (2018):

Intracellular free magnesium concentration in healthy horses.

J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 102(5): 1351-1356. DOI: 10.1111/jpn.12921.

Wylie, C. E. and Collins, S. N. (2010):

Equine insulin resistance: the quest for sensitivity.

Vet J 186: 275-276. DOI: 10.1016/j.tvjl.2009.11.023.

Wylie, C. E., Collins, S. N., Verheyen, K. L. and Newton, J. R. (2013):

Risk factors for equine laminitis: a case-control study conducted in veterinary-registered horses and ponies in Great Britain between 2009 and 2011.

Vet J 198: 57-69. DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.08.028.

Wyse, C. A., Mcnie, K. A., Tannahil, V. J., Murray, J. K. and Love, S. (2008):

Prevalence of obesity in riding horses in Scotland.

Veterinary Record 162: 590-591. DOI: DOI 10.1136/vr.162.18.590.

Anhang

Allgemeine Angaben zum Patienten

1. Wie wird Ihr Pferd gehalten?

2. Wie wird Ihr Pferd derzeit genutzt? (Art der Nutzung, Länge der Bewegung, Leistung, freie Tage etc.)

3. Was bekommt Ihr Pferd derzeit für Futtermittel und in welcher Menge?

4. Bekommt Ihr Pferd zusätzlich z.B. zur Belohnung Leckerlies, Möhren, Bananen etc.?

5. Hat Ihr Pferd Vorerkrankungen?

6. Bekommt Ihr Pferd derzeit Medikamente?

7. Folgende Menge Magnesium wird/wurde verabreicht:

Beurteilung von Effekten der Magnesiumgabe aus Sicht der Pferdehalter

1. Muskuläre Beeinträchtigungen

- Muskelverspannungen?
- Muskuläre Blockaden?
- Rittigkeitsprobleme?

Vor der Magnesiumgabe

Vorhanden/zutreffend?

ja nein

Falls ja, bitte Beschreibung:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Während der Magnesiumgabe

Vorhanden/zutreffend?

ja nein

Falls ja, bitte Beschreibung:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Nach Beendigung der Magnesiumgabe

Vorhanden/zutreffend?

ja nein

Falls ja, bitte Beschreibung:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

2. Verhaltensauffälligkeiten

- Nervosität/Unruhe?
- Schreckhaftigkeit/Schreckreaktionen/Bodenscheuheit?
- Stressempfindlichkeit?
- Unwilliges Verhalten/Arbeitsunlust?
- Koppen/Weben/Flehmen?

Vor der Magnesiumgabe

Vorhanden/zutreffend?

ja nein

Falls ja, bitte Beschreibung:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Während der Magnesiumgabe

Vorhanden/zutreffend?

ja nein

Falls ja, bitte Beschreibung:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Nach Beendigung der Magnesiumgabe

Vorhanden/zutreffend?

ja nein

Falls ja, bitte Beschreibung:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

3. Allgemeine Leistungsfähigkeit

- Mangelnde Ausdauer?
- Bewegungsunlust?
- Schweratmigkeit?
- Starkes Schwitzen?

Vor der Magnesiumgabe

Vorhanden/zutreffend?

ja nein

Falls ja, bitte Beschreibung:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Während der Magnesiumgabe

Vorhanden/zutreffend?

ja nein

Falls ja, bitte Beschreibung:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Nach Beendigung der Magnesiumgabe

Vorhanden/zutreffend?

ja nein

Falls ja, bitte Beschreibung:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

4. Verdauung

- Verdauungsprobleme, z.B. dunkle, feste Pferdeäpfel oder zu flüssiger Kot?
- Wiederkehrende Koliken?
- Unverträglichkeiten?

Vor der Magnesiumgabe

Vorhanden/zutreffend?

ja nein

Falls ja, bitte Beschreibung:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Während der Magnesiumgabe

Vorhanden/zutreffend?

ja nein

Falls ja, bitte Beschreibung:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Nach Beendigung der Magnesiumgabe

Vorhanden/zutreffend?

ja nein

Falls ja, bitte Beschreibung:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

5. Hautstoffwechsel und Fellbeschaffenheit

- Stumpfes, struppiges, glanzloses Haarkleid?
- Gestörter Fellwechsel?
- Hautirritationen?
- Weitere Auffälligkeiten?

Vor der Magnesiumgabe

Während der Magnesiumgabe

**Nach Beendigung der
Magnesiumgabe**

Vorhanden/zutreffend?

ja nein

Falls ja, bitte Beschreibung:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Vorhanden/zutreffend?

ja nein

Falls ja, bitte Beschreibung:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Vorhanden/zutreffend?

ja nein

Falls ja, bitte Beschreibung:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

6. Harnapparat

- Vermehrter Harnabsatz?
- Weitere Auffälligkeiten?

Vor der Magnesiumgabe

Während der Magnesiumgabe

**Nach Beendigung der
Magnesiumgabe**

Vorhanden/zutreffend?

ja nein

Falls ja, bitte Beschreibung:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Vorhanden/zutreffend?

ja nein

Falls ja, bitte Beschreibung:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Vorhanden/zutreffend?

ja nein

Falls ja, bitte Beschreibung:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

7. Bitte schätzen Sie Ihr Pferd ein! (Die Erklärung zur Einteilung des BCS(=Body Condition Score) nach Henneke finden Sie auf einer separaten Tafel)

Vor der Magnesiumgabe

- BCS 1
- BCS 2
- BCS 3
- BCS 4
- BCS 5
- BCS 6
- BCS 7
- BCS 8
- BCS 9

Nach Beendigung der Magnesiumgabe

- BCS 1
- BCS 2
- BCS 3
- BCS 4
- BCS 5
- BCS 6
- BCS 7
- BCS 8
- BCS 9

8. Verträglichkeit / Akzeptanz

Nach Beendigung der Magnesiumgabe:

Gab es Probleme bei der Verabreichung des Magnesiumproduktes?

ja nein

Falls ja, bitte Beschreibung:

.....
.....
.....
.....
.....

Wurden Unverträglichkeiten während der Magnesiumgabe wahrgenommen?

ja nein

Falls ja, bitte Beschreibung:

.....
.....
.....
.....
.....

Waren unerwünschte Effekte zu beobachten?

ja nein

Falls ja, bitte Beschreibung:

.....
.....
.....
.....
.....

Lieber Pferdebesitzer, liebe Pferdebesitzerin

Ihr Pferd leidet an der Erkrankung „Equines Metabolisches Syndrom“. Hierbei handelt es sich um eine Erkrankung des Stoffwechsels, ähnlich wie Diabetes des Menschen.

Bei Menschen mit Diabetes liegt häufig ein Mangel an Magnesium im Blut oder in den Zellen vor. Eine Supplementierung der Nahrung mit Magnesium über den Bedarf hinaus verbessert beim Menschen die Insulinsensitivität und mindert die klinischen Auswirkungen von Diabetes.

Im Rahmen unserer Untersuchung möchten wir bei untersuchen, ob eine Magnesiumfütterung bei Ihrem Pferd die Insulinresistenz senkt. Hierfür wird Ihr Pferd für drei Monate einmal täglich mit Magnesium (Nupafeed liquid®, Verla-Pharm) oder einem Placeboprodukt versorgt. Dieses Magnesiumprodukt enthält die besonders gut resorbierbare Verbindung Magnesiumaspartat-hydrochlorid und ist bereits als Futterzusatzmittel etabliert. Es wird von Pferden gut vertragen und lässt sich leicht von Ihnen selbst oral oder über das Futter verabreichen. Ob Ihr Pferd das Magnesiumpräparat oder das Placebopräparat bekommt, wissen wir selbst nicht und können es auch nicht beeinflussen.

Während der Zeit der Magnesium-/Placebofütterung sollten Fütterung-, Haltungs- und Bewegungsmanagement möglichst nicht geändert werden. Nach drei Monaten findet eine Nachuntersuchung in unserer Klinik statt. Die Versorgung mit Magnesium/Placebo und die Nachuntersuchung sind kostenfrei. Im Untersuchungsrahmen sind die Bestimmung der Magnesiumkonzentration im Blut und in der Zelle, der Triglyzeride und Leberenzyme enthalten.

Die Teilnahme an dieser Untersuchung ist freiwillig. Falls Sie sich hierzu entscheiden, bitten wir Sie allerdings, die Magnesium- oder Placebogabe zuverlässig durchzuführen und nach drei Monaten zur Nachuntersuchung in unsere Klinik zu kommen.

Ihr Pferd _____ bekommt einmal täglich _____ ml
Magnesium/Placebo ins Maul oder ins Futter verabreicht.

Der Nachuntersuchungstermin wird telefonisch vereinbart.

Vielen Dank für Ihre Zusammenarbeit!

Ich erkläre mich hiermit mit der Durchführung des EMS-Tests, weiterer Blutuntersuchung und der täglichen Gabe des Magnesium-/Placebopräparats einverstanden.

Berlin, Datum

PferdebesitzerIn

Tierärztin

Checkliste Magnesiumuntersuchung bei Equinem Metabolischen Syndrom

Erstuntersuchung/ Nachuntersuchung

Daten

Pferdename:

Besitzername:

Veteranummer (Fall):

Datum:

Foto erledigt

Klinische Untersuchung

Auffälligkeiten Allgemeinuntersuchung:

Gewicht (kg):

CNS (0-5):

BCS (1-9):

Größe (cm):

Orthopädische US (LH Grad 0-5):

Hufzangentest:

positiv

negativ

OBEL Score (0-4):

Intrazelluläres Mg²⁺(mmol/L)

Blut einfrieren für RNA-Extraktion, ZP 0 und 45 Min erledigt

Wo: Internistik, abgeschlossene Box, -80° Kühlschrank, grüne Box („Mg“), Fach:

Was: EDTA-Blut (je 4 ml plusXX RNAlater, verteilt auf Kryoröhrchen)

Beschriften: Tiername, Datum, ZP 0 oder 45

Boxnummer:

Blut einfrieren für ELISAs (Adiponektin, Leptin), ZP 0 erledigt

Wo: Physiologie, -80° Kühlschrank, grüne Box („Mg“), Fach:

Was: Serum, vorher abzentrifugieren innerlab von 30 Min nach Abnahme, 20 min, 1000g

Beschriften: Tiername, Datum

Boxnummer:

Labordiagnostik

Zeitpunkt 0: Blutgasanalyse, 3x Serum, 2x EDTA (inkl. wegfrieren für RNA), 4x Lithium-Heparin (zur Sicherheit)

Zeitpunkt 45: Blutgasanalyse, 1x Serum, 1x EDTA (zum Wegfrieren für RNA), 4x Lithium-Heparin

Intern:

Glukose-0-Wert (mg/dL) *Blutgas*

GGT (U/L) *Serum*

LDH (U/L) *Serum*

GLDH (U/L) *Serum*

TG (mg/dL) *Serum*

Ca²⁺ Serum (mmol/L) *Blutgas*

Berechnen:

RISQI ((mU/L)^{-0.5})

MIRG (mU²/10.L.mg)

HOMA-Index

Versand:

Insulin-0-Wert (µU/ml) *Serum 1ml*

Insulin-45-Wert (µU/ml) *Serum 1ml*

ACTH (pg/ml) *EP, 0.5 ml, direkt abzentrifugieren*

Fructosamine (µmol/L) *Serum 1ml*

Mg²⁺ Serum (mmol/L) *Serum 0,5 ml*

Bei Laboklin als Einzelmessungen: ACTH, Insulin (2x), Fructosamin, Magnesium

Bitte angeben Insulin 0 und 45 Minuten bei Bemerkungen

CGIT

erledigt

CGIT – Combined glucose-insuline test

Patient

Studien-ID: _____

Name: _____

Besitzer: _____

Veteranr.: _____

Vorbereitung

6 Stunden **Hungern** – ab: _____ Uhr (Maulkorb und Wassereimer)

12 Stunden **keine Sedation!!!**

Katheter rechts /links

Körpergewicht: _____ kg

Kein Stress!!!

Nüchternwertermittlung:

Uhrzeit: _____ Uhr

Glucose 0: _____ Insulin 0: _____

Applikation von Glukose und Insulin:

Uhrzeit: _____ Uhr

Glucoseinfusion (150 mg/kg)

mit 40%iger Glucoselösung (enthält 0,4 g/ml)

- $KGW \times 150 =$ _____ mg = _____ g (benötigte Glucose)
- $Ben\ddot{o}tigte\ Glucose\ (g)/0,4 =$ _____ ml

Insulininjektion (0,1 I.E./kg)

Caninsulin® (40 I.E./ml; entsprechend 1 I.E./0,025ml), in 1,5ml isotonischer NaCl-Infusionslösung

- $KGW \times 0,1 =$ _____ I.E. (benötigtes Insulin)
- $Ben\ddot{o}tigtes\ Insulin\ (I.E.) \times 0,025ml =$ _____ ml

Blutwertermittlung post Applikation:

Uhrzeit: bis _____ Uhr

Glucose 1: _____

Glucose 5: _____

Glucose 15: _____

Glucose 25: _____

Glucose 35: _____

Glucose 45: _____ Insulin 45: _____

Glucose 60: _____

Glucose 75: _____

Glucose 90: _____

Glucose 105: _____

Glucose 120: _____

Glucose 135: _____

Glucose 150: _____

Befundauswertung:

Positiv

- Glucose erst nach ≥ 75 Minuten wieder auf Basalniveau
- Insulin erhöht (siehe Laboklinbefunde, anhängend)

Negativ

Protokoll Zellisolation

Material

1. Li-Hep. Röhrchen

- Menge: 2 Röhrchen/Probe
- WO: in Internistik, erste Box rechts, oberes Regelfach ganz links
- Nachbestellen: Frau Blank/ Frau Ahrens

2. PBS Lonza mit 0,8 mmol/l $MgCl_2$ zugesetzt

- Menge: 16 ml/Probe
- VORHER ANMISCHEN!!: pro 500 ml Flasche 0,4 mmol und von der 1 molaren Lösung 0,4 ml. GUT MISCHEN!!
- WO: in Internistik, abgeschlossene Box, Regal links; $MgCl_2$ in Physiologie, Nasslabor, links an der Wand. Auf Konzentration achten!!
- Nachbestellen: PBS Annette Ziesche

3. Histopaque

- Menge: 20 ml/Probe
- WO: in Physiologie in Kühlkammer
- IMMER BESCHRIFTEN mit Datum und Pferdeklinik!!
- Nachbestellen: Judith Winter

4. HBSS mit 0.8 mmol/l $MgCl_2$ zugesetzt

- Menge: 50 ml/Probe
- VORHER ANMISCHEN!!: pro 500 ml Flasche 0,4 mmol und von der 1 molaren Lösung 0,4 ml. GUT MISCHEN!!
- WO: in Physiologie in Kühlkammer
- IMMER BESCHRIFTEN mit Datum und Pferdeklinik!!
- Nachbestellen: Judith Winter

Vorgehen

Pro Probe 2 Ansätze:

- 2x 8 ml Lithium Heparin Blut mischen mit 2x8 ml PBS mit $MgCl_2$
- Vorsichtig pipettieren auf je 10 ml Histopaque
- In Zentrifuge in 3. Raum links in Physiolabor 20 Min, 21 °C, 700g
- Lymphozytenschicht abnehmen

- In Zentrifuge (gleiche) 7 Min, 21°C, 550 *g*
- Überstand verwerfen, resuspendieren in 10 ml HBSS mit MgCl₂
- In Zentrifuge (gleiche) 7 Min, 21°C, 550 *g*
- Überstand verwerfen, resuspendieren in 10 ml HBSS mit MgCl₂
- In Zentrifuge (gleiche) 7 Min, 21°C, 550 *g*
- Überstand verwerfen, resuspendieren in 1 ml HBSS

Messung der Zellzahl

- Am automated cell counter, neben Mg-Messgerät
- 10 µl der Probe mischen mit 10 µl Tryptanblau, davon 10 µl auf Messslide
- Reinstecken, Zellgrenzen einstellen (5-10 µm)
- Zellzahl notieren

Protokoll Zellloading

Schließt sich unmittelbar an Zellisolation an

Material

1. MagFura 2

- Menge: 2x 8,7 µl/Probe
- WO: Anbruch in Physiologie, Gerhards Labor, Tiefkühlfach, rosa Schachtel; Vorrat: Internistik, abgeschlossene Box, Gefrierschrank oberstes Fach
- Nachbestellen: Judith Winter
- Wichtig: neues MagFura in 208 µl DMSO (unter Werkbank) lösen, nach Gebrauch Rest einfrieren
- CAVE: LICHTEMPFLINDLICH!!!Nicht draußen stehen lassen

2. HBSS (Reste von Zellisolation)

Vorgehen

- Zu jeder Einzelprobe je 8,7 µl MagFura zugeben, mischen
- 30 min inkubieren auf Rüttelplatte, abgedeckt
- Zentrifugieren 5 min, 400 *g* in kleiner Zentrifuge in Raum1
- Überstand verwerfen, resuspendieren in 1 ml HBSS mit MgCl₂
- 20 Min inkubieren auf Rüttelplatte, abgedeckt
- Zentrifugieren 5 min, 400 *g*

- Überstand verwerfen, resuspendieren in 1 ml HBSS mit MgCl_2
- Einzelproben wieder zu Sammelprobe zusammenfügen

Protokoll Magnesiummessung

Gerätecheck und Programm

- Gerät anstellen inkl. Wärmeding und PC
- FLWinlab öffnen
- Stirrer anschalten: fta.mth - fastfilter markieren, auf oberen linken Button, Stirrer auf high, schließen
- Speicherpfad eingeben: Utilities, Configurations, Data, load (data – XX)
- Messfenster öffnen: Doppelklick auf fta.mth
- Speichername eingeben: bei setup parameters, unten bei destination filenames Name eintragen und bei user info: Pferdename und Messungszeitpunkt ZP 0 oder 45
- Messlauf starten: View results und oben auf Ampel

Material

- 20 μl EDTA (0,5 mmol/l) und 100 μL EGTA (100 mmol/l)
- 20 μl Triton X 100 (10%ig)
- 200 μl MgCl_2 (1mol/l)

Vorgehen

- Basisfluoreszenz messen, bis Messlinie stabil
- Loading prüfen (oberen Messlinien sollten mind. bei 50 liegen)
- 20 μl EDTA, 100 μl EGTA zugeben
- Warten, bis Linie stabil
- 20 μl Triton
- Warten, bis Linie stabil
- 200 μl MgCl_2
- Warten, bis Linie stabil
- Fertig, Messung stoppen, Programm schließen, speichert automatisch, checken, ob Dateien da sind
- Alle Geräte wieder ausmachen, PC runterfahren

Zufallsschema Verteilung Gruppe A/ Gruppe B

Pferd	Zufallszahl	Gruppe
1	0,10232777	A
2	0,39350906	A
3	0,3760903	A
4	0,75085107	B
5	0,31969745	A
6	0,18700653	A
7	0,44738175	A
8	0,99020911	B
9	0,20761039	A
10	0,96387814	B
11	0,37021038	A
12	0,75938674	B
13	0,76250686	B
14	0,19868927	A
15	0,31149371	A
16	0,28365117	A
17	0,58135711	B
18	0,42415599	A
19	0,27768343	A
20	0,5701314	B
21	0,82494505	B

Anhang

22	0,69059694	B
23	0,47427706	A
24	0,98692049	B
25	0,17193359	A
26	0,19363804	A
27	0,50545329	B
28	0,39972978	A
29	0,27062836	A
30	0,18377813	A
31	0,17862297	A
32	0,28163629	A
33	0,70886687	B
34	0,72141896	B
35	0,56511733	B
36	0,66702846	B
37	0,50105453	B
38	0,79213869	B
39	0,90194549	B
40	0,78502045	B
41	0,70111138	B
42	0,58123063	B
43	0,6274203	B
44	0,24735139	A

45	0,47284957	A
46	0,60383308	B
47	0,89491645	B
48	0,39075581	A
49	0,30763507	A
50	0,78646189	B

Publikationen

Winter, J. C., Müller, E., Sponder, G., Merle, R., Aschenbach, J. R. and Gehlen, H. (2020):

Relationship between intracellular free magnesium concentration and the degree of insulin resistance in horses with equine metabolic syndrome.

Pferdeheilkunde 36 (4): 325-331. DOI: 10.21836/Pem20200406.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen, die mich bei und während der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben, herzlich bedanken.

Zuallererst gilt mein Dank meiner Supervisorin Frau Prof. Dr. Heidrun Gehlen für die Vergabe des Themas, die fachliche Betreuung und die Möglichkeit, meine Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe an der Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin anfertigen zu dürfen.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Jörg Aschenbach bedanken. Durch ihn und seine Mitarbeiter war es unserer Arbeitsgruppe möglich, einen Großteil unserer Laborarbeit im Labor des Institutes für Veterinär-Physiologie durchzuführen. In diesem Zusammenhang danke ich Herrn Dr. Gerhard Sponder und Frau Katharina Söllig, die mir bei allen Laborfragen mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Judith Winter und Frau Dr. Sabita Stöckle, die Teil der Arbeitsgruppe waren und nicht nur aktiv bei der Durchführung der Studie mitgeholfen, sondern mir auch immer aufmunternde Worte entgegengebracht haben, wenn mal etwas nicht nach Plan lief. Insbesondere möchte ich Frau Dr. Judith Winter herzlich für das fleißige Korrekturlesen, die konstruktive Kritik und das immer offene Ohr danken.

Ich möchte mich auch bei Frau Dr. Roswitha Merle für ihre Geduld und ihre großartige Unterstützung bei der Auswertung der Daten bedanken.

Der Firma Verla-Pharm danke ich für die Bereitstellung des Ergänzungsfuttermittels und Herrn Dr. Anton Kraus für die fachliche Beratung.

Dem gesamten Team der Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Christoph Lischer möchte ich für die Unterstützung, die mir u.a. bei meiner alltäglichen Arbeit entgegengebracht wird, sowie die Vermittlung von fachlichem Wissen und praktischen Kompetenzen danken. Die freundliche Arbeitsatmosphäre und der kollegiale Umgang tragen nicht zuletzt zur Freude an meinem Beruf und dem Spaß an der Arbeit bei.

Meinen Freunden, ob nah oder fern, danke ich für jegliche Art der emotionalen und tatkräftigen Unterstützung.

Meiner Schwester danke ich dafür, dass sie immer für mich da ist und ich mich schon mein Leben lang auf sie verlassen kann.

Mein größter Dank soll meinen Eltern gewidmet sein. Sie haben mir das Studium ermöglicht und mir auf diesem Weg immer und ohne zu zögern beigestanden. „Vielen Dank für eure lebenslange Unterstützung und eure liebevolle Art mir immer zur Seite zu stehen.“

Interessenskonflikte – Conflict of Interest

Es besteht kein Interessenskonflikt durch finanzielle oder materielle Unterstützung der Arbeiten.

Selbstständigkeitserklärung

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

Berlin, den 10.12.2021

Eva Maria Therese Müller



mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-152-0