

**Aus der Pferdeklinik  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

**Ermüdungs- und Erholungsmonitoring  
bei Vielseitigkeitspferden nach Geländeprüfungen  
Eignung blutbasierter Biomarker für die Leistungsdiagnostik**

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

**vorgelegt von  
Johanna Clara Giers  
Tierärztin aus Frankfurt am Main**

**Berlin 2024  
Journal-Nr.: 4468**







Aus der Pferdeklinik  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

# Ermüdungs- und Erholungsmonitoring bei Vielseitigkeitspferden nach Geländeprüfungen

Eignung blutbasierter Biomarker für die Leistungsdiagnostik

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

vorgelegt von  
**Johanna Clara Giers**  
Tierärztin aus Frankfurt am Main

Berlin 2024  
Journal-Nr.: 4468

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: Prof. Dr. Anna May  
Dritter Gutachter: PD Dr. Kerstin Müller

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

Horses, horse riding, biological markers, diagnostic techniques, amyloid, blood serum, oxidative stress, myocardium, troponin I, recovery, exercise

Tag der Promotion: 22.07.2024

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-96729-257-2

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2024**

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 2024 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

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

# Inhaltsverzeichnis

<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>I. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>II. Literaturübersicht .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Prüfungsanforderungen in der Disziplin Vielseitigkeit .....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Prüfungsarten .....	2
2.1.2. Prüfungsformate .....	2
2.1.3. Prüfungsniveau .....	2
2.1.4. Anforderungen in der Geländeprüfung .....	3
<b>2.2. Forschungsstand zu Verletzungsrisiken und Leistungsphysiologie in         Geländeritten.....</b>	<b>4</b>
<b>2.3. Ermüdungsdefinitionen .....</b>	<b>5</b>
2.3.1. Muskelermüdung: Periphere und zentrale Ermüdung .....	5
2.3.2. Kardiale Ermüdung .....	5
<b>2.4. Ermüdungsindikatoren in der humanen Leistungsdiagnostik.....</b>	<b>7</b>
<b>2.5. Blutbasierte Biomarker für verschiedene Organsysteme .....</b>	<b>7</b>
2.5.1. Hämatologie.....	7
2.5.2. Skelettmuskulatur .....	8
2.5.3. Kardiale Marker .....	9
2.5.4. Hormone .....	10
2.5.5. Oxidativer Stress und antioxidative Mechanismen .....	11
2.5.6. Entzündung.....	11
2.5.7. Metabolismus.....	13
<b>2.6. Plasmavolumenverschiebung .....</b>	<b>13</b>
<b>III. Publikationen .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Publikation I .....</b>	<b>15</b>
Giers, J.; Bartel, A.; Kirsch, K.; Müller, S.F.; Horstmann, S.; Gehlen, H. (2023): Blood- Based Markers for Skeletal and Cardiac Muscle Function in Eventing Horses before and after Cross-Country Rides and How They Are Influenced by Plasma Volume Shift. Animals 2023, 13, 3110. <a href="https://doi.org/10.3390/ani13193110">https://doi.org/10.3390/ani13193110</a>	

---

<b>3.2. Publikation II .....</b>	<b>37</b>
Giers, J.; Bartel, A.; Kirsch, K.; Müller, S.F.; Horstmann, S.; Gehlen, H. (2024): Blood-based assessment of oxidative stress, inflammation, endocrine and metabolic adaptations in eventing horses accounting for plasma volume shift after exercise, Veterinary Medicine and Science, 10, e1409. <a href="https://doi.org/10.1002/vms3.1409">https://doi.org/10.1002/vms3.1409</a>	
<b>IV. Diskussion.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1. Plasmavolumenadjustierung.....</b>	<b>55</b>
<b>4.2. Kriterien zur Auswahl blutbasierter Biomarker für ein Ermüdungs- und Erholungsmonitoring .....</b>	<b>56</b>
4.2.1. Interpretation der Ergebnisse hinsichtlich Eignung als leistungs- diagnostischer Marker .....	56
4.2.2. Marker für den Flüssigkeitshaushalt .....	57
4.2.3. Marker für die Muskulatur .....	57
4.2.4. Marker für die Herzmuskulatur .....	59
4.2.5. Hormonelle Marker .....	59
4.2.6. Marker für antioxidative Mechanismen .....	59
4.2.7. Entzündungsmarker.....	60
4.2.8. Marker für Metabolismus und Spurenelemente .....	60
<b>4.3. Vergleich mit Erkenntnissen der humanen Leistungsdiagnostik.....</b>	<b>60</b>
<b>4.4. Diskussion zur Ermüdung und Erholung.....</b>	<b>61</b>
<b>4.5. Beurteilung der Ermüdung und Erholung in der Studienpopulation.....</b>	<b>62</b>
<b>4.6. Limitationen .....</b>	<b>63</b>
<b>4.7. Methodische Implikationen.....</b>	<b>64</b>
<b>4.8. Ausblick auf zukünftige Forschung.....</b>	<b>64</b>
<b>4.9. Konklusion zum Gesamtprojekt.....</b>	<b>65</b>
<b>V. Zusammenfassung .....</b>	<b>66</b>
<b>VI. Summary .....</b>	<b>67</b>
<b>VII. Anhang .....</b>	<b>68</b>
<b>VIII. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>69</b>
<b>IX. Publikationsverzeichnis.....</b>	<b>80</b>
<b>X. Danksagung .....</b>	<b>81</b>
<b>XI. Finanzierungsquellen.....</b>	<b>82</b>
<b>XII. Erklärung zu Interessenskonflikten .....</b>	<b>83</b>
<b>XIII. Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>84</b>



---

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1	CCI-Geländeritt – Distanzen – Sprünge – Geschwindigkeiten	S. 9
Tab. 2	CCI-Geländeritt – Hindernisse – Maximale Dimensionen	S. 9

### Artikel 1

---

Tab. 1	Age, sex and breed of participating horses in cross-country rides	S. 23
Tab. 2	Cross-country competition information, as well as distance, speed, environmental parameters, ground, and altitude profile	S. 24
Tab. 3	Blood-based biomarker and associated categories	S. 25

---

### Artikel 2

---

Tab. 1	Characteristics of horses participating in the study	S. 45
Tab. 2	Cross-country competition information, as well as distance, speed, environmental parameters, ground, and altitude profile	S. 46
Tab. 3	Blood-based biomarker and associated categories	S. 47

---

Tab. 3	Evaluierung der untersuchten blutbasierten Parameter	S. 63
Tab. 4	Gruppenbasierte 95 % Konfidenzintervalle aller untersuchten blutbasierten Marker	S. 73

---

## Abbildungsverzeichnis

### Artikel 1

---

Abb. 1 (a – h)	Estimated marginal means (EMM) (white dots) and their 95% confidence intervals (black whiskers) of fluid balance blood parameters at measured time points	S. 28
Abb. 2 (a – c)	Estimated marginal means (EMM) (white dots) and their 95% confidence intervals (black whiskers) of muscle enzymes at measured time points	S. 29
Abb. 3 (a – f)	Estimated marginal means (EMM) (white dots) and their 95% confidence intervals (black whiskers) of muscle metabolites at measured time points	S. 30
Abb. 4	Estimated marginal means (EMM) (white dots) and their 95% confidence intervals (black whiskers) of cTnI at measured time points	S. 31

---

### Artikel 2

---

Abb. 1 (a – c)	Changes in hormones after exercise	S. 50
Abb. 2 (a – b)	Changes in antioxidative markers after exercise	S. 50
Abb. 3 (a – f)	Changes in hepatic values after exercise	S. 51
Abb. 4 (a – e)	Changes in digestion associated parameters after exercise	S. 52
Abb. 5 (a – d)	Changes in trace elements after exercise	S. 53
Abb. 6 (a – b)	Changes in inflammatory markers after exercise	S. 54

---

---

## Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin/ Serotonin
AAS	Atom-Absorptions-Spektrometrie
ADMA	Asymmetrischen-Dimethyl-Arginin
Alb	Albumin
ALT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Anorg. Phosphat	Anorganisches Phosphat
AP	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosin-Triphosphat
CCI2*/CCI3*/CCI4*	Concours Complet International auf Zwei/ Drei/ Vier-Sterne-Niveau
CHOL	Cholesterin
CIC1*	Concours International Combiné auf Ein-Sterne-Niveau
CK	Kreatinkinase
CREA	Kreatinin
cTnI	Kardiales Troponin I
cTnT	Kardiales Troponin T
DGGR	1,2-o-dilauryl-rac-glycero-3-gludaric acid-Methode
DOKR	Deutsches Olympiade Komitee für Reiterei
e.g.	Zum Beispiel (lateinisch: <i>exempli gratia</i> )
EICF	Belastungsinduzierte kardiale Ermüdung (englisch: <i>exercise induced cardiac fatigue</i> )
EMM	Erwarteter Mittelwert (englisch: <i>estimated marginal mean</i> )
FEI	Fédération Equestre Internationale
FN	Deutsche Reiterliche Vereinigung e.V.
g/l	Gramm pro Liter
GGT	$\gamma$ -Glutamyltransferase
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
GLOB	Globuline
HCT	Hämatokrit
HGB	Hämoglobin
HLC	High-performance Liquid Chromatographie
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HPT	Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse
IL	Interleukin

---

Inorg. Phosphat	Anorganisches Phosphat
km/h	Kilometer pro Stunde
l	Liter
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LIA	Chemilumineszenz Assay
m	Meter
m/min	Meter pro Minute
mg/l	Milligramm pro Liter
min	Minute
mmol/l	Millimol pro Liter
MPO	Myeloperoxidase
ng/dl	Nanogramm pro Liter
PET	Polyurethane Terephthalat
PHO	Photometrie
POT	Potentiometrie
Pre	Vor Belastung
RBC	Erythrozyten (englisch: Red Blood Cells)
REGman	Regenerationsmanagement im Spitzensport
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SAA	Serum-Amyloid A
SDMA	Symmetrisches-Dimethyl-Arginin
SETs	Standardisierte Belastungstests
SOD	Superoxid-Dismutase
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
TG	Triglyceride
TP	Total Protein
u.a.	Unter anderem
U/l	Units pro Liter
U/ml	Units pro Milliliter
UREA	Harnstoff
Vit. E	Vitamin E
VLA4	Geschwindigkeit bei einem Laktatwert von 4 mmol/l
WBC	Leukozyten/ Weiße Blutkörperchen (englisch: White Blood Cells)
z.B.	Zum Beispiel

---

## I. Einleitung

Die Disziplin „Vielseitigkeit“ ist in den letzten Jahren verstärkt in die öffentliche Kritik geraten, da es immer wieder zu Stürzen mit tödlichen Folgen für Pferde und ReiterInnen gekommen ist (Bennet et al. 2023). Dieses Risiko manifestiert sich vor allem in der Geländeprüfung, in der die Pferd-ReiterIn-Paare in Durchschnittstempo von bis zu 34 km/h, 25 bis 40 solide gebaute Hindernisse auf einer bis zu 6,3 km langen Geländestrecke überwinden (FEI 2022). Die Belastung der Pferde variiert bei internationalen Prüfungen zwischen submaximaler und maximaler Belastungsintensität (Kirsch et al. 2020).

Neben Einflussfaktoren wie Kursgestaltung, reiterliche Expertise und Wetterbedingungen spielt der Trainingszustand des Pferdes als Sicherheitsfaktor eine zentrale Rolle (Bennet et al. 2023). Es ist bekannt, dass die Ermüdung der Pferde auf der Geländestrecke ein erhebliches Sturzrisiko bedeutet (Bennet et al. 2023). Gezieltes Training gilt daher als bedeutsame Präventivmaßnahme.

In der humanen Leistungsdiagnostik wird Ermüdung als ein normaler Bestandteil des Trainingsprozesses angesehen, der auch in gewissem Maß Voraussetzung für Trainingsfortschritte ist (Meyer et al. 2016, Meyer et al. 2020). Im menschlichen Hochleistungssport hat sich gezeigt, dass die Beurteilung des Ermüdungszustandes und der Erholung hilfreich ist, um den Trainingszustand der Athleten einzuschätzen (Hecksteden et al. 2015, Hecksteden et al. 2017, Julian et al. 2017, Hecksteden und Meyer 2018, Hecksteden et al. 2018, Barth et al. 2019, Hacker et al. 2021).

Notwendige Schritte, um diese Erkenntnisse auf Vielseitigkeitspferde zu übertragen, sind die Identifizierung belastungsabhängiger Parameter, die Definition gruppenbasierter Referenzbereiche und die Auswahl geeigneter Parameter für die Erstellung individueller Referenzbereiche (Hecksteden et al. 2015, Hecksteden et al. 2017, Julian et al. 2017, Hecksteden und Meyer 2018, Hecksteden et al. 2018, Barth et al. 2019, Hacker et al. 2021). Das Hauptziel dieser Arbeit ist es, Veränderungen in muskulären, kardialen, endokrinen, oxidativen und metabolischen Parametern nach intensiver körperlicher Belastung zu detektieren. Insbesondere sollen belastungsabhängige, blutbasierte Biomarker identifiziert werden, um ein Panel für die Leistungsdiagnostik von Vielseitigkeitspferden zusammenzustellen. Diese Dissertation strebt somit an, die Leistungsdiagnostik bei Vielseitigkeitspferden zu optimieren, um das Verletzungsrisiko für diese Hochleistungstiere zu verringern.

## **II. Literaturübersicht**

### **2.1. Prüfungsanforderungen in der Disziplin Vielseitigkeit**

Bei der Vielseitigkeit handelt es sich um einen reiterlichen Mehrkampf, der sich aus den drei Teilprüfungen Dressur, Geländeritt und Springen zusammensetzt. Die Prüfungsanforderungen differieren je nach Prüfungsart, Prüfungsformat und Prüfungsniveau. ReiterInnen bestreiten jede Teilprüfung mit demselben Pferd.

#### **2.1.1. Prüfungsarten**

Auf internationalem Niveau gibt es, gemäß der Regeln der Fédération Equestre Internationale (FEI) (FEI 2022), verschiedene Prüfungsarten. Prüfungen mit individueller Rangierung werden als „CCI“ (Concours Complet International) ausgetragen, Prüfungen mit einer offiziellen Teamwertung und einer Einzelklassierung als „CIO“ (Concours International Officiel) und Nationenpreise als „NC“ (Nation Cups), die also ausschließlich aus einer Teamwertung bestehen. Außerdem gibt es Meisterschaften, die als „CH“ (Championships) ausgeschrieben werden, bei denen es ebenfalls eine Team- und eine Einzelwertung gibt.

#### **2.1.2. Prüfungsformate**

Die Prüfungen werden im Langformat, Kurzformat oder als Einlaufprüfung ausgeschrieben. Bei einer Prüfung im Langformat „CCI-L“ („-Long“) findet die Prüfung über mindestens drei Tage hinweg statt. Die Dressurprüfung findet vor der Geländeprüfung und diese wiederum vor der Springprüfung statt. Die Geländeprüfung hat eine Länge, die ein hohes Fitnesslevel und eine gute Ausdauer von den Pferden erfordert (FEI 2022).

Eine Prüfung im Kurzformat „CCI-S“ („-Short“) kann auch an nur einem Tag abgehalten werden. Die Reihenfolge der Teilprüfungen ist dabei flexibler, wobei die Dressurprüfung immer als erste Teilprüfung stattfindet. Gelände- und Springprüfung folgen in beliebiger Reihenfolge. Die Abfolge der Hindernisse auf der Geländestrecke ist dabei schneller als beim Langformat, weil die Streckenlänge kürzer ist.

Das dritte Prüfungsformat ist die Einlaufprüfung „CC1\*-Intro“, die als Lang- oder Kurzformat auf dem niedrigsten Schwierigkeitslevel ausgerichtet wird.

#### **2.1.3. Prüfungsniveau**

Die Schwierigkeitsgrade werden mit einem progressiven System von eins bis fünf Sternen eingeteilt, wobei eine 5-Sterne-Prüfung ein maximales Trainingslevel und ein Maximum an Erfahrung erfordert.

Ein Pferd-ReiterIn-Paar muss sich durch mehrere Platzierungen in einem Schwierigkeitsgrad qualifizieren, um an einer Prüfung mit höherem Schwierigkeitsgrad teilzunehmen. Da in der

Studie Geländerritte auf 2-Sterne- bis 4-Sterne-Niveau untersucht wurden, wird in der Folge nur auf die spezifischen Anforderungen in diesen Prüfungsniveaus eingegangen.

#### 2.1.4. Anforderungen in der Geländeprüfung

Die Anzahl der Hindernisse, deren Abmessungen, die Geschwindigkeit sowie die Länge der Strecke folgen bei internationalen Veranstaltungen den Regeln der FEI (FEI 2022). Die Anforderungen in 2-Sterne- bis 4-Sterne-Geländeprüfung sind in Tab. 1 und Tab. 2 zusammengefasst.

**Tab. 1: CCI-Geländerritt – Distanzen – Sprünge – Geschwindigkeiten**

Level		Zwei Sterne		Drei Sterne		Vier Sterne	
Prüfungsformat		Kurzformat	Langformat	Kurzformat	Langformat	Kurzformat	Langformat
Distanz (m)	Min	2600	3640	3025	4400	3420	5700
	Max	3120	4680	3575	5500	3990	6270
Hindernisse (Anzahl)	Min	25	25	27	30	30	35
	Max	30	30	32	35	35	40
Geschwindigkeiten (m/min)		520	520	550	550	570	570
Zeit (min)	Min	05:00	07:00	05:30	08:00	06:00	10:00
	Max	06:00	09:00	06:30	10:00	07:00	11:00

**Tab. 2: CCI-Geländerritt – Hindernisse – Maximale Dimensionen**

Prüfungsniveau	Zwei Sterne	Drei Sterne	Vier Sterne
Feste Elemente (m)	1.10	1.15	1.20
Bürsten (m)	1.30	1.35	1.40
Weite Obere Kante (m)	1.40	1.60	1.80
Weite Basis (m)	2.10	2.40	2.70
Flache Hindernisse (m)	2.80	3.20	3.60
Bergab Hindernisse (m)	1.60	1.80	2.00

## 2.2. Forschungsstand zu Verletzungsrisiken und Leistungsphysiologie in Geländeritten

Eine Reihe von Studien hat sich mit den Belastungsintensitäten und den damit verbundenen Risiken bei Vielseitigkeitsprüfungen befasst. Murray et al. (2004) identifizierten Schnittverletzungen, Muskelverletzungen, Frakturen und Sehnenverletzungen als häufigste Verletzungen nach Geländeritten. Hövener et al. (2020) stellten fest, dass belastungsbedingte Myopathien eine wichtige Ursache für Leistungsschwächen im Pferdesport, insbesondere in der Vielseitigkeit sind. Bei Sportpferden ist eine myokardiale Dysfunktion eine weitere mögliche Ursache für Leistungsschwäche (Hövener et al. 2020). Bennet et al. (2023) fanden heraus, dass die Kursgestaltung einen großen Einfluss auf die Sturzwahrscheinlichkeit hat und empfehlen, schwierige Hindernisse eher zu Beginn der Geländestrecke und nicht im Kontext mit Wasser oder bergab zu positionieren. Dies hänge auch mit der zunehmenden Ermüdung im Verlauf der Geländestrecke zusammen (Bennet et al. 2023).

Auch verschiedene Aspekte der Leistungs- und Trainingsphysiologie wurden an Vielseitigkeitspferden untersucht. Kirsch und Sandersen (2020) untersuchten den Säure-Basen-Haushalt bei an internationalen Geländeprüfungen teilnehmenden Pferden und stellten fest, dass es in Folge der Geländeprüfung zu einer metabolischen Acidose kommt. Kirsch et al. (2020) untersuchten außerdem in einer retrospektiven Analyse die Herzfrequenz und die Blutlaktatkonzentration nach 1463 Geländeprüfungen bei 294 Pferden. Die mittlere Herzfrequenz und Blutlaktatkonzentration stiegen vom 2-Sterne- zum 4-Sterne-Niveau signifikant an. Jeder Anstieg der mittleren Geschwindigkeit um 30 m/min war mit einem Anstieg der Herzfrequenz um 3 Schläge/min und einem Anstieg der Laktatkonzentration um 41% verbunden. Die Herzfrequenzen während der ersten 3 Minuten der Erholung waren bei wärmeren und feuchteren Bedingungen höher.

Bezogen auf das Trainingsmanagement untersuchten Munsters et al. (2020) die Akut-Chronische-Arbeitsbelastung (Acute-Chronic-Workload), und stellten fest, dass einzelne Belastungsspitzen im Trainingsplan das Verletzungsrisiko der Pferde erhöhen. Munsters et al. (2014) verglichen außerdem Stufenbelastungstest bei Pferden unterschiedlicher Disziplinen. Die Autoren stellten fest, dass die Geschwindigkeit bei einem Laktatwert von 4 mmol/l (VLA4) und die Erholungs-Herzfrequenz bei submaximaler Belastungsintensität in Zusammenhang mit der Leistung und drohenden Verletzungen bei Vielseitigkeitspferden stehen und gut geeignete Parameter zur Bewertung von Veränderungen der Fitness zu sein scheinen (Munsters et al. 2014).



Obwohl diese Studien wertvolle Einblicke in belastungsinduzierte Veränderungen und Risiken bei Vielseitigkeitspferden bieten, sind bisher keine weiteren blutbasierten Marker zur Messung von Ermüdung und Erholung festgelegt worden. Zunächst sind hierfür Definitionen der Begriffe „Ermüdung“ und „Erholung“ notwendig.

## **2.3. Ermüdungsdefinitionen**

Ermüdung ist ein komplexes, multifaktorielles Ereignis, das sich aus peripheren und zentralen Komponenten zusammensetzt (Edwards 1981, Ament und Verkerke 2009, Arfuso et al. 2021). Kardiale Ermüdung ist ein Zustand, bei dem es zu vorübergehenden Veränderungen der Herzmuskelleistung durch körperliche Belastung kommt (Scott und Warburton 2008).

### **2.3.1. Muskelermüdung: Periphere und zentrale Ermüdung**

Die Muskelermüdung wurde von Degens und Veerkamp (1994) als die Abnahme der Kraftproduktionsfähigkeit des Muskels während konstanter Kontraktionen definiert. Dabei beschrieben sie auch die Ermüdungsresistenz als die Fähigkeit des Muskels, diesem Abfall der Kraftproduktion zu widerstehen.

Die periphere Ermüdung bezieht sich auf den Verlust an Kontraktionskraft oder -leistung, der durch Prozesse in der motorischen Endplatte und der Muskelzelle selbst hervorgerufen wird (Degens und Veerkamp 1994). Im Gegensatz dazu beschreibt die zentrale Ermüdung einen Verlust, der im zentralen Nervensystem, proximal der neuromuskulären Verbindung, entsteht (Westerblad et al. 1991, Gandevia 2001). Aktuelle Definitionen erweitern den Begriff der peripheren Ermüdung um Dysfunktionen des peripheren Nervensystems, sowohl sensorische als auch motorische Neuronen, und beschränken den Begriff der zentralen Ermüdung auf die Unfähigkeit oder den Unwillen des zentralen Nervensystems, motorische Neuronen zu aktivieren (Ament und Verkerke 2009).

Neuere Forschungen, wie von Hureau et al. (2022) und Degens und Jones (2020) legen nahe, dass intramuskuläres anorganisches Phosphat maßgeblich für die periphere Ermüdung während des Trainings verantwortlich ist, während Muskelazidose als Ursache für zentrale Ermüdung betrachtet wird.

### **2.3.2. Kardiale Ermüdung**

Während sich die periphere Ermüdung auf die Skelettmuskulatur bezieht, bezeichnet kardiale Ermüdung einen Zustand, der mit einer Schädigung der Herzmuskelzellen verbunden sein kann (Scott und Warburton 2008). Kardiale Ermüdung wurde in verschiedenen menschlichen Sportdisziplinen durch die Anwendung von Sonographie oder Bluttests festgestellt. Dabei wurden sowohl Veränderungen in der systolischen als auch in der diastolischen Funktion der

linken Herzkammer beobachtet (Scharhag et al. 2008, Scott und Warburton 2008, Oxborough et al. 2010, George et al. 2012, La Gerche et al. 2012, Claessen et al. 2014, Stewart et al. 2015, Stewart et al. 2016, Kleinnibbelink et al. 2021). Im Kontext der aktuellen Forschung wird die kardiale Ermüdung nur dann als pathologisch angesehen, wenn sie mit Anzeichen einer Myokardnekrose einhergeht (Tjora et al. 2011, Lippi und Sanchis-Gomar 2020).

Flethøj et al. (2016) untersuchten die kardiale Ermüdung erstmals in einer Querschnittsstudie mit 26 Pferden, die an Distanzritten über 120-160 km teilnahmen. Flethøj et al. (2016) stellten fest, dass längere aerobe Belastung bei Pferden ebenfalls mit einer Verschlechterung der diastolischen Funktion des linken Ventrikels einhergeht. Die Änderungen im Hydratationszustand, festgestellt durch die Veränderungen biochemischer Indikatoren, beeinflussen die Vorlastbedingungen. Da sich diese biochemischen Indikatoren des Hydratationszustandes früher als die verminderte ventrikuläre Füllung wieder normalisierten, schlussfolgerten die Autoren, dass die beobachteten Veränderungen nicht allein auf die veränderten Vorlastbedingungen zurückzuführen sind. Es wurde keine Korrelation zwischen den echokardiographischen Variablen und dem kardialen Troponin I gefunden.

Gunther-Harrington et al. (2018) untersuchten dreißig mit Furosemid behandelte Vollblutpferde vor und unmittelbar nach hochklassigen Galopprennen und stellten eine Zunahme der Anzahl von Pferden mit Regurgitation durch die Aorta und die Atrioventrikular-Klappen nach dem Rennen fest. Die systolische Funktion war signifikant erhöht. cTnI unterschied sich nicht zwischen den Zeitpunkten vor und unmittelbar nach dem Rennen, war aber 4 Stunden nach Belastung signifikant erhöht. Bis 24 Stunden nach der Belastung sank der cTnI-Wert wieder auf den Ausgangswert.

Wijnberg und Franklin (2017) fassen die Auswirkungen von Sport auf die kardiale Remodellierung beim Pferd und die möglichen Auswirkungen auf die sportliche Leistung zusammen. Der kardiale Umbau als Reaktion auf sportliche Betätigung ist im Allgemeinen für die sportliche Leistung vorteilhaft, da das Herzzeitvolumen zunimmt. Dieser Umbau kann auch zu einer erhöhten Prävalenz von Herzgeräuschen und Herzrhythmusstörungen führen. Die Vorhersage, für welche Individuen potenziell schädliche Auswirkungen von körperlicher Anstrengung zu erwarten sind, stellt jedoch eine Herausforderung dar, da viele Sportler unter belastungsinduzierten Herzgeräuschen und Arrhythmien leiden, die klinisch nicht relevant sind.

## **2.4. Ermüdungsindikatoren in der humanen Leistungsdiagnostik**

Die Messung von Ermüdungsindikatoren verfolgt in der humanen Leistungsdiagnostik im Allgemeinen zwei Ziele. Das erste Ziel besteht darin, AthletInnen mit Regenerationsbedarf zu erkennen und den Trainingsplan entsprechend anzupassen, auch um Verletzungen zu vermeiden (Meyer et al. 2016). Indirekt werden hierbei auch die gut trainierten oder voll erholten AthletInnen erkannt. Das zweite Ziel besteht darin, Regenerationsmaßnahmen zu bewerten (Meyer et al. 2016). Dies kann sowohl in der leistungssportlichen Praxis für ein Individuum als auch im Rahmen wissenschaftlicher Studien für eine Gruppe von AthletInnen geschehen.

Es gibt verschiedene Arten von Messwerten. Neben einfachen motorischen Tests werden im humanen Leistungssport Laborwerte oder psychometrische Messwerte (z.B. Ermüdungs-Erholungs-Fragebogen (Kallus und Kellmann 2016)) verwendet (Meyer et al. 2016). Die Anforderungen an die Messwerte sind dabei vielfältig. Die Messgröße soll empfindlich gegenüber der sportartspezifischen Belastung sein, d.h. für unterschiedliche Sportarten müssen ggf. unterschiedliche Messgrößen verwendet werden (Meyer et al. 2016). Außerdem soll die Messgröße robust gegenüber Alltagseinflüssen wie Wetter, Ernährung, Schlafverhalten oder Gemütslage sein (Meyer et al. 2016). Die Messgröße soll außerdem wiederholbare Ergebnisse liefern, die Messung darf entsprechend nicht zu teuer sein und die Bestimmung der Messgröße soll keine zusätzliche Ermüdung hervorrufen (Meyer et al. 2016). Durch das Projekt „Regenerationsmanagement im Spitzensport“ (REGman) des Bundesinstituts für Sportwissenschaften wurde im humanen Leistungssport erstmals eine Validierung von Ermüdungsmarkern bei trainierten Leistungssportlern unterschiedlicher Disziplinen durchgeführt (Meyer et al. 2016, Meyer et al. 2020).

## **2.5. Blutbasierte Biomarker für verschiedene Organsysteme**

Der Vorteil der Messung labordiagnostischer Parameter besteht darin, dass die metabolischen und muskulären Aspekte trainingsinduzierter Ermüdung nachgewiesen und quantifiziert werden. Die technischen Messfehler sind bei Laborparametern in der Regel sehr klein und eine Beeinträchtigung des Individuums entsteht nur durch die Blutentnahme, was zu keiner weiteren Ermüdung führt, und die Messung mehrerer Laborparameter ermöglicht (Meyer et al. 2016). Für viele Parameter gibt es einen klaren Bezug zu spezifischen physiologischen Prozessen.

### **2.5.1. Hämatologie**

Die hämatologische Blutuntersuchung gibt einen Überblick über den Anteil zellulärer Bestandteile am Blut (Hämatokrit, RBC, WBC) und die Sauerstofftransportkapazität des Blutes (Hämoglobin). Diese Parameter sind wichtig, um einen Überblick über den

Gesamtgesundheitszustand der Pferde zu erhalten. Die Hämatologie allein ist jedoch nicht ausreichend, um die Leistungsfähigkeit und Erholung der Pferde zu beurteilen, da die Parameter unspezifisch in Bezug auf trainingsabhängige Veränderungen sind.

Erhöhten Hämoglobin- und Erythrozytenwerten wird insgesamt ein positiver Einfluss auf die Leistung zugeschrieben (Wickler und Anderson 2000). Erhöhte Hämatokrit-Werte hingegen, lassen auf einen erniedrigten Hydratationsstatus schließen, der wiederum zu erhöhten renalen Ausscheidungsraten bei Distanzritten führen könnte (Bollinger et al. 2021). Flethøj et al. (2016) und Gunther-Harrington et al. (2018) maßen hämatologische Parameter bei Distanz- respektive Rennpferden.

### **2.5.2. Skelettmuskulatur**

Bei Menschen wird die Messung der Enzyme Kreatinkinase (CK), Laktat-Dehydrogenase (LDH) und Aspartataminotransferase (AST) empfohlen, um Informationen über die Schädigung von Muskelzellen zu erhalten (Mair et al. 2015, Hacker et al. 2021, Schusser 2017). Die Messung der Muskelenzyme hat sich auch beim Pferd seit langem in der Diagnostik belastungsinduzierter Myopathien bewährt und wurde in zahlreichen Studien zur Beurteilung der Skelettmuskelfunktion von Vielseitigkeitspferden vor und nach Geländeritten eingesetzt (Andrews et al. 1995, Marlin et al. 1995, Art et al. 2006, Lejeune et al. 2010, Schusser 2017, Williams und Burk 2012).

Die Kreatinkinase (CK) gilt als klassischer Ermüdungsmarker für Kraft- und Schnellsportarten, deren Zusammenhang mit trainingsbedingter Ermüdung und Erholung für menschliche AthletInnen vielfach bewiesen wurde (Meeusen et al. 2013, Raeder et al. 2016). Der zuverlässige Anstieg von CK nach der Belastung, sowie die Korrelation zwischen CK-Erhöhung und Grad der muskulären Belastung, machen CK auch zu einem sensitiven und spezifischen Ermüdungsmarker beim Pferd (Schusser 2017). Im Vielseitigkeitssport diente CK bereits in verschiedenen Studien zur Einschätzung der muskulären Beanspruchung der teilnehmenden Pferde (Marlin et al. 1995, Lejeune et al. 2010, Williams und Burk 2012). Kürzlich konnte außerdem ein Zusammenhang zwischen erhöhten CK-Werten vor dem Start und der Wahrscheinlichkeit wegen Lahmheit aus einem Distanzritt auszuschneiden, hergestellt werden (Bollinger et al. 2021).

Die Aussagekraft der CK-Werte ist jedoch bisher durch die große Gesamtvariabilität begrenzt, die Variabilität innerhalb eines Sportlers kann aber deutlich geringer sein (Hecksteden et al. 2017). Mithilfe wiederholter Messungen werden bei menschlichen AthletInnen individuelle Referenzbereiche erstellt, woraus sich ein deutlich erhöhter Erkenntnisgewinn im Vergleich zu bisherigen Protokollen ergeben kann (Hecksteden et al. 2017).

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein Enzym, das bei Zelluntergang aus Herz- und Skelettmuskulatur, aber auch anderen Organen ins Blut gelangt (EclinPath, Schusser 2017).

LDH ist in der Blutbahn sehr stabil und zeigt Muskelschäden sensitiv an (Brancaccio et al. 2006, Schusser 2017).

Das Enzym Aspartataminotransferase (AST) ist nicht organspezifisch, jedoch finden sich in der Skelettmuskulatur und Leber die höchsten Konzentrationen (EclinPath). AST ist deshalb nützlich als Indikator von Leber- und Muskelverletzungen bei Groß- und Kleintieren (EclinPath).

Neben den Muskelenzymen wird auch Laktat seit Jahrzehnten als Marker für muskuläre bzw. metabolische Beanspruchung untersucht. Laktat entsteht während der Glykolyse in Muskelzellen aus Pyruvat (EclinPath). Schon Amory et al. (1993) stellten den exponentiellen Anstieg von Laktat während submaximaler Belastung bei Vielseitigkeitspferden fest. Kirsch et al. (2020) untersuchten an einer mit der vorliegenden Studie vergleichbaren, aber deutlich größeren Studienpopulation den Einfluss verschiedener Einflussfaktoren auf die Laktatkonzentration und die Laktat-Eliminierungsrate. Im Vergleich zu Warmblütern hatten Pferde mit höherem Vollblutanteil um 34 % niedrigere Laktatwerte. Jede Zunahme des Alters um 5 Jahre war mit einer Abnahme des Laktates um 11 % verbunden. Die Geschwindigkeit der Laktatelimination war bei Pferden mit höherem Vollblutanteil höher.

### **2.5.3. Kardiale Marker**

In der Vergangenheit wurden viele verschiedene blutbasierte Marker auf ihre Sensitivität und Spezifität für die Herzmuskulatur nach körperlicher Belastung untersucht (Gehlen et al. 2006, Gehlen et al. 2018). Beim Menschen wurden zunächst CK und ihr herzmuskelspezifisches Isoenzym CK-MB sowie LDH und ihr herzmuskelspezifisches Isoenzym  $\alpha$ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase ( $\alpha$ -HBDH) zur Diagnose von Myokardinfarkten und akuten Myokarditiden eingesetzt (Fromm und Roberts 2001, Gehlen et al. 2006, Mair et al. 2015). Ein Anstieg von CK-MB wird mit einer Myozytenschädigung und Apoptose in Verbindung gebracht. (Wijnberg und Franklin 2017). Für  $\alpha$ -HBDH steigt nach Myokardinfarkten langsamer an und hat eine lang anhaltende Plateauphase (Dissmann et al. 1998). Gehlen et al. (2018) stellten fest, dass die Bestimmung der Endothelin-1-Plasmakonzentration bei Pferden in Ruhe nützlich sein kann, um Pferde mit Veränderungen der Herzgröße des linken Vorhofs zu erkennen. Die Studie von Ertelt et al. (2021) bestätigte den Zusammenhang zwischen Herzerkrankungen und erhöhten Asymmetrischen-Dimethyl-Arginin (ADMA)-Konzentrationen im Serum sowie einem erniedrigten L-Arginin/ADMA-Verhältnis bei Pferden.

Bei den nicht-enzymatischen Markern der Myokardfunktion weisen Troponin T (cTnT), Troponin I (cTnI) und Myoglobin unterschiedliche Vor- und Nachteile auf. Myoglobin ist zwar weniger herzspezifisch als cTnT, ist bei Herzinfarktpatienten jedoch bereits wenige Stunden nach Symptombeginn messbar (Fromm und Roberts 2001, Gehlen et al. 2006). cTnT ist wiederum weniger herzmuskelspezifisch als cTnI, weshalb cTnI als sicherster blutbasierter

Marker der Myokardfunktion gilt (Fromm und Roberts 2001, Gehlen et al. 2006). CTnT und cTnI kommen in Aktin-Myosin-Komplexen in Herzmuskelzellen vor.

CTnI hat sich als spezifischer Parameter für Myokardschäden etabliert, da es nur dann in den Blutkreislauf gelangt, wenn die Herzmuskelzellen einer erhöhten Belastung ausgesetzt sind (Alpert et al. 2000, Phillips et al. 2003, Gehlen et al. 2006, O'Brien et al. 2006, Tjora et al. 2011, Mair et al. 2015, Baker et al. 2019). In den letzten Jahren wurden eine hochsensitive Tests für die Messung von cTnI bei Pferden validiert (Rossi et al. 2018).

Der Anstieg von cTnI bei Distanzpferden nach Ausdauerritten deutet darauf hin, dass auch bei Pferden kardiale Ermüdung auftritt (Holbrook et al. 2006, Flethøj et al. 2016, Ertelt et al. 2021). Bei Rennpferden zeigte Rossi et al. (2021), dass erhöhte cTnI-Konzentrationen und Herzrhythmusstörungen nach dem Rennen auf eine Myokardschädigung hinweisen. Gunther-Harrington et al. (2018) beschreiben, dass belastungsinduzierte kardiale Ermüdung (EICF) und Herzrhythmusstörungen bei Rennpferden auftreten. Diese Studie untersucht erstmals, ob Herzermüdung auch bei Vielseitigkeitspferden auftritt.

#### **2.5.4. Hormone**

In der Vergangenheit wurden Hypothesen über die Beteiligung verschiedener Neurotransmitter an der Entstehung zentraler Ermüdung entwickelt, darunter Serotonin (5-HT; 5-Hydroxytryptamin), Dopamin und Acetylcholin. Auch  $\beta$ -Endorphin, ACTH und Cortisol wurden bei Pferden nach körperlichen Belastungen bereits untersucht (Malinowski et al. 2006, Liburt et al. 2013). Normalwerte und Veränderungen von Cortisol, als Marker des autonomen Tonus während einer Wettkampfsaison wurden von Lorello et al. (2017) untersucht.

Cortisol moduliert körperliche und geistige Leistungsanforderungen auf der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA) (González et al. 1998, Liburt et al. 2013, Fazio et al. 2015, Ferlazzo et al. 2018, Kowalik und Tomaszewska 2018, Ferlazzo et al. 2020). Ferlazzo et al. (2018) fasst zusammen, dass in verschiedenen Pferdesportarten eine Beteiligung der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse (HPT) und eine Verbindung zur HPA-Achse bei der Reaktion auf körperliche Betätigung vermutet, aber noch nicht verstanden wird. Auch Jodthyronine, insbesondere Trijodthyronin (T<sub>3</sub>), haben einen signifikanten Einfluss auf den Sportstoffwechsel und beschleunigen die Umwandlung von Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten auf zellulärer Ebene (Ferlazzo et al. 2018, Ferlazzo et al. 2020). Während Thyroxin (T<sub>4</sub>) nur in der Schilddrüse gebildet werden kann, kann T<sub>3</sub> auch extrathyreoidal in Zielgeweben wie den Muskeln synthetisiert werden (Fazio et al. 2015). T<sub>3</sub> steigt nach standardisierten Belastungstests bei Standardrennpferden (Fazio et al. 2022) und nach Höchstgeschwindigkeitstests bei Vollblutrennpferden (González et al. 1998). Ein T<sub>4</sub>-Anstieg 30 Minuten nach Belastung wurde nur in Einzelfällen nach unterschiedlichen

Belastungsintensitäten beobachtet, während die T4-Werte 24 Stunden nach der Belastung häufig verändert sind (Ferlazzo et al. 2020).

### **2.5.5. Oxidativer Stress und antioxidative Mechanismen**

Oxidativer Stress entsteht durch ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion und der Neutralisierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Siqueira et al. 2014, Williams 2016). Oxidativer Stress kann zu Muskelschäden, Ermüdung und Leistungsabfall führen (Williams et al. 2004, Siqueira et al. 2014). Um die schädlichen Auswirkungen von ROS zu reduzieren, spielen antioxidative Abwehrsysteme eine entscheidende Rolle, die aus enzymatischen Komponenten wie Superoxiddismutase (SOD) oder Myeloperoxidase (MPO) und nicht-enzymatischen Komponenten wie Tocopherolen (u.a. Vitamin E) oder Plasma- $\beta$ -Carotin bestehen (Siqueira et al. 2014).

Williams und Burk (2012) berichteten erstmals über den antioxidativen Status von Pferden, die an einer dreitägigen Veranstaltung auf CCI2\*- und CCI3\*-Niveau teilnahmen. Williams und Burk (2012) maßen ein höheres Plasma- $\beta$ -Carotin und ein höheres Erythrozyten-Glutathion bei den CCI2\*-Pferden als bei den CCI3\*-Pferden. Williams und Burk (2012) führte die zwischen den Abteilungen beobachteten Veränderungen der Antioxidantien auf die höheren anaeroben und muskuloskelettalen Anforderungen an die Pferde der höheren Klassen und die für den Wettkampf auf diesem Niveau erforderliche Fitness zurück.

Art et al. (2006) fanden heraus, dass die Degranulation von neutrophilen Granula im Blut durch Bewegung induziert wird. Sie maßen die Gesamtkonzentration von MPO, einem spezifischen Enzym der azurophilen neutrophilen Granula mit hoher oxidativer Aktivität, vor und nach dem Geländeritt bei 9 Ponys während einer Vielseitigkeitsmeisterschaft (CIC1\*). Die submaximale Belastung führte zu einem signifikanten Anstieg von CK, MPO und Granulozyten. Art et al. (2006) vermuteten, dass dieses Phänomen zum Auftreten von belastungsinduziertem oxidativem Stress und zur Veränderung der Durchlässigkeit der Blutgefäße beitragen könnte.

### **2.5.6. Entzündung**

Es ist bekannt, dass eine intensive Belastung der Skelettmuskulatur zu einer Entzündungsreaktion führen kann, wenn die Belastung mit einer Schädigung der Muskelfasern einhergeht (Clarkson und Hubal 2002, Ament und Verkerke 2009). Als blutbasierte Marker wurden bei Pferden eine Vielzahl an Zytokinen (Witkowska-Pilaszewicz et al. 2020), verschiedene Akute-Phase-Proteine (Cywinska et al. 2012, Valle et al. 2015, Mihelic et al. 2022), sowie verschiedene Zellfraktionen (Lejeune et al. 2010, Valle et al. 2015, Witkowska-Pilaszewicz et al. 2020) untersucht. Einige Untersuchungen beziehen sich auf IL-6, ein proinflammatorisches Zytokin, das nach intensiver Belastung aus Muskelzellen frei wird (Clarkson und Hubal 2002, Ament und Verkerke 2009). Valle et al. (2015) fanden Anstiege der Akute-Phase-Proteine Lysozym, Protein-Carbonyl-Derivaten, Lymphozyten-Subpopulationen,

Haptoglobin und SAA nach einer Geländeprüfung. Lejeune et al. (2010) fanden bei Vielseitigkeitspferden außerdem signifikant erhöhte Konzentrationen von Neutrophilen Granulozyten, CK und Myeloperoxidase nach 1-Sterne- und 2-Sterne-Geländeritten, woraus Lejeune et al. (2010) schlossen, dass intensive körperliche Belastung eine systemische Entzündungsreaktion induziert.

Witkowska-Pilaszewicz et al. (2020) untersuchten an 14 untrainierten und 14 gut trainierten Galopprennpferden die Vermehrung bestimmter Immunzellen, Lymphozytenpopulationen und die Monozytenfunktionalität, die Produktion von ROS und die Zellproliferation mittels Durchflusszytometrie sowie die Konzentrationen von Interleukinen, Interferon- $\gamma$  und Tumor-Nekrosefaktor- $\alpha$  nach 800 m Sprint mit 800 m/min. Es zeigte sich, dass bei trainierten Pferden ein entzündungshemmender Zustand entsteht, der als Anpassungsreaktion auf das Training anzusehen ist.

Der Anstieg der Leukozytenzahl (WBC) nach Belastung wurde in mehreren Studien dokumentiert. Dieser Anstieg wird durch drei Effekte beeinflusst: lokale Entzündungsreaktionen in der Muskulatur (Horohov et al. 2012, Mihelic et al. 2022), Aktivierung von Leukozyten durch erhöhte Sympathikusaktivität (Muñoz et al. 1999, Mihelic et al. 2022) und Kontraktion der Milz (Carakostas et al. 1981, Muñoz et al. 1999, McGowan 2008). Etliche Studien beziehen sich auf Serum-Amyloid A (SAA): Einen hochsensitiven, aber unspezifischen Entzündungsmarker (Witkowska-Pilaszewicz et al. 2019). Der große Vorteil von SAA besteht darin, dass das Akute-Phase-Protein bereits wenige Stunden nach dem auslösenden Ereignis ansteigt (Witkowska-Pilaszewicz et al. 2019). SAA wurde bei Pferden untersucht, um verschiedene subklinische Pathologien zu erkennen und die Reaktion auf eine Behandlung zu überwachen (Valle et al. 2015, Turlo et al. 2016, Kowalik und Tomaszewska 2018, Witkowska-Pilaszewicz et al. 2019, Witkowska-Pilaszewicz et al. 2019, Long und Nolen-Walston 2020).

Es gibt verschiedene Studien im Zusammenhang mit SAA bei Distanzpferden (Cywinska et al. 2010, Cywinska et al. 2012, Siqueira und Fernandes 2016, Rajendren et al. 2019), Springpferden (Carvalho Filho et al. 2019) und Rennpferden (Giori et al. 2011, Kristensen et al. 2014, Turlo et al. 2015, Turlo et al. 2016, Kowalik und Tomaszewska 2018) vor und nach körperlicher Belastung, sowie im Verlauf einer Trainingsperiode (Witkowska-Pilaszewicz et al. 2019, Arfuso et al. 2020, Miglio et al. 2020). Turlo et al. (2016) fanden heraus, dass Galopprennen zu geringgradigen Veränderungen der SAA-Konzentration führen, die für die trainingsinduzierte Akute-Phase-Reaktion typisch sind. Valle et al. (2015) beobachtete keinen Anstieg der SAA, aber einen Anstieg der Leukozytenwerte nach einem nationalen italienischen Vielseitigkeitswettbewerb bei acht Warmblutpferden, obwohl SAA empfindlicher für Entzündungen ist als die Anzahl der weißen Blutkörperchen (WBC) (Long und Nolen-Walston 2020).



### **2.5.7. Metabolismus**

Der Geländeritt stellt aerobe und mit zunehmender Schwierigkeit auch zunehmend anaerobe metabolische Anforderungen an den Pferdekörper (Amory et al. 1993, Muñoz et al. 1999, Williams und Burk 2012). Anaerobe Energie kann durch anaerobe Glykolyse aus Glukose und über den Kreatin-Phosphat-Adenosin-Triphosphat-Weg bereitgestellt werden (McGowan et al. 2002, Ament und Verkerke 2009). Die aerobe Energieversorgung beruht auf der aeroben Glykolyse von Kohlenhydraten oder der  $\beta$ -Oxidation von Fetten (EclinPath, McGowan et al. 2002, Ament und Verkerke 2009).

Metabolischer Stress wird durch den erhöhten Energiebedarf bei körperlicher Betätigung verursacht (EclinPath, Ament und Verkerke 2009). Metabolischer Stress kann auch zu einer Anhäufung von Stoffwechselprodukten führen, die zu Müdigkeit und Muskeler schöpfung beitragen können (McGowan et al. 2002, Ament und Verkerke 2009, Hureau et al. 2022, Mihelic et al. 2022).

## **2.6. Plasmavolumenverschiebung**

Es gibt drei bedeutende Effekte, die den Wasserhaushalt während und nach der Belastung beeinflussen. Erstens setzt die Milzkontraktion zusätzliche rote Blutkörperchen in den Blutkreislauf frei, um die Sauerstofftransportkapazität zu erhöhen, was den Hämatokrit (HCT) während der Belastung bei intakten Pferden im Vergleich zu splenektomierten Pferden in einem inkrementellen Laufbandtest um bis zu 10 % erhöht (McKeever et al. 1993). Zweitens kommt es zu einer Verschiebung des Plasmavolumens vom intravaskulären in den extravaskulären Raum, da der hydrostatische Druck während der Belastung ansteigt (Masri et al. 1990, McKeever et al. 1993, Flethøj et al. 2016, Assunção et al. 2019). Drittens kommt es zu einem Flüssigkeitsverlust (Dehydrierung) durch Schwitzen und Atmung (Muñoz et al. 2010, Assunção et al. 2019).

Blutwerte werden als Konzentrationen angegeben, die grundsätzlich als Menge pro Volumen definiert sind. Während der Belastung ändert sich nicht nur die Menge des Blutparameters (Zelle, Enzym, Metabolit), sondern auch das Volumen aufgrund der drei Effekte der Milzkontraktion, des intravasalen Plasmavolumenverlusts und der Dehydration. Dies bedeutet, dass Veränderungen der Menge der Blutparameter maskiert oder simuliert werden können. Um die Veränderungen einzelner Blutparameter nach einer Belastung zu verstehen und Rückschlüsse auf die Funktion bestimmter Systeme wie der Skelettmuskulatur zu ziehen, kann es hilfreich sein, Volumeneffekte von Mengeneffekten zu trennen.



## III. Publikationen

### 3.1. Publikation I:

**Titel:** Blood-Based Markers for Skeletal and Cardiac Muscle Function in Eventing Horses before and after Cross-Country Rides and How They Are Influenced by Plasma Volume Shift

**AutorInnen:** Giers, J.; Bartel, A.; Kirsch, K.; Müller, S.F.; Horstmann, S.; Gehlen, H.

**Zeitschrift:** Animals

**Verlag:** MDPI

**DOI:** <https://doi.org/10.3390/ani13193110>

**License:** CC BY 4.0

**Veröffentlicht am:** 05.10.2023

**Zitation:** Giers, J.; Bartel, A.; Kirsch, K.; Müller, S.F.; Horstmann, S.; Gehlen, H. (2023): Blood-Based Markers for Skeletal and Cardiac Muscle Function in Eventing Horses before and after Cross-Country Rides and How They Are Influenced by Plasma Volume Shift. *Animals* 2023, 13, 3110. <https://doi.org/10.3390/ani13193110>

Name	Bezeichnung AutorIn	Erläuterung Anteil Leistung
<b>Johanna Giers</b>	Erstautorin	Formale Analyse, Durchführung der Untersuchungen, Datenkuratierung, Erstellung des Manuskripts, Erstellen von Abbildungen
<b>Alexander Bartel</b>	Co Autor	Software, Validierung, Formale Analyse, Datenkuratierung, Korrekturlesen des Manuskripts, Erstellen von Abbildungen
<b>Katharina Kirsch</b>	Co Autorin	Konzeptualisierung, Methodik, Validierung, Beschaffung von Ressourcen, Korrekturlesen des Manuskripts, Fördermittelakquise
<b>Simon Franz Müller</b>	Co Autor	Validierung, Beschaffung von Ressourcen, Korrekturlesen des Manuskripts
<b>Stephanie Horstmann</b>	Co Autorin	Konzeptualisierung, Methodik, Korrekturlesen des Manuskripts
<b>Heidrun Gehlen</b>	Co Autorin	Konzeptualisierung, Methodik, Validierung, Beschaffung von Ressourcen, Korrekturlesen des Manuskripts, Supervision, Projektadministration, Fördermittelakquise

Article

# Blood-based markers for skeletal and cardiac muscle function in eventing horses before and after cross-country rides and how they are influenced by plasma volume shift

Johanna Giers <sup>1,\*</sup>, Alexander Bartel <sup>2</sup>, Katharina Kirsch <sup>3</sup>, Simon Franz Müller <sup>4</sup>, Stephanie Horstmann <sup>5</sup> and Heidrun Gehlen <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Equine Clinic, Internal Medicine, Freie Universität Berlin, Oertzenweg 19b, 14193 Berlin, Germany

<sup>2</sup> Institute for Veterinary Epidemiology and Biostatistics, Freie Universität Berlin, Königsweg 67, 14163 Berlin, Germany; alexander.bartel@fu-berlin.de

<sup>3</sup> Department Sensors and Modeling, Leibniz Institute for Agricultural Engineering and Bioeconomy (ATB), Max-Eyth Allee 100, 14469 Potsdam, Germany, kkirsch@atb-potsdam.de

<sup>4</sup> Laboklin Veterinary Laboratory Diagnostics, Steubenstrasse 4, 97688 Bad Kissingen, Germany; sf.mueller@laboklin.com

<sup>5</sup> German Olympic Committee for Equestrian Sports (DOKR), Freiherr-von-Langen-Straße 15, 48231 Warendorf, Germany; shorstmann@fn-dokr.de

\* Correspondence: johanna.giers@web.de

**Simple Summary:** Horses participating in cross-country tests are subjected to high physical stress. In this study, blood values of 20 horses were examined before and after cross-country rides. The aim was to determine whether blood-based markers of muscle function change after cross-country rides. Parameters that provide information about fluid balance, muscle enzymes, metabolites and cardiac muscle-specific markers were investigated. We developed an approach to eliminate the concentration changes caused by shifts in fluid balance. Parameters were measured before, ten and 30 minutes after exercise and the next morning and evaluated using a mixed model. At 30 minutes post exercise, most parameter concentrations changed exercise-dependent. The next morning, most exercise-dependent markers recovered rapidly, creatine kinase (CK) (26 % increase;  $p=0.008$ ) and lactate dehydrogenase (LDH) (15 % increase;  $p<0.001$ ) showed a declining but sustained increase. Cardiac troponin I (cTnI) increased above the reference range in 40 of 55 rides (73 %) and in 18 of 20 horses in the morning after exercise.

**Abstract:** Horses competing in cross-country tests are subjected to high physical demands. Within the scope of this prospective longitudinal study, blood values of 20 elite eventing horses were examined before and after 2- to 4-star cross-country rides. The aim was to find out whether blood-based markers for skeletal muscle and cardiac muscle function change after cross-country exercise. Parameters that provide information about fluid balance, muscle enzymes, metabolites and cardiac muscle-specific markers were investigated. We developed an approach to eliminate the concentration changes caused by reduced plasma volume. Parameters were measured pre, ten and 30 minutes post exercise and the next morning and evaluated using a mixed model. 30 minutes after exercise, most parameter concentrations changed exercise dependent. The next morning, most exercise-related markers recovered rapidly, while creatine kinase (CK) (26 % increase;  $p=0.008$ ) and lactate dehydrogenase (LDH) (15 % increase;  $p<0.001$ ) showed a declining but sustained increase. Cardiac troponin I (cTnI) increased above the reference range in 40 of 55 rides (73 %) and in 18 of 20 horses in the morning after exercise.

**Keywords:** eventing, cross-country, exercise, recovery, sport horses, cardiac muscle, cardiac Troponin I (cTnI), performance diagnostics, equine sport physiology

**Citation:** Giers J.; Bartel, A.; Kirsch, K.; Müller, S.F.; Horstmann, S.; Gehlen, H. Blood-Based Markers for Skeletal and Cardiac Muscle

Function in Eventing Horses before and after Cross-Country Rides and How They Are Influenced by Plasma Volume Shift. *Animals* **2023**, *13*, 3110. <https://doi.org/10.3390/ani13193110>

Received: 9 August 2023

Revised: 1 October 2023

Accepted: 3 October 2023

Published: 5 October 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

In recent years, the equestrian discipline of eventing has received increased attention due to growing concerns about the welfare of horses in cross-country competitions. These demanding competitions require horses to jump over solid obstacles at high speed, putting them under considerable physical strain. To reduce the risk of injury and ensure the health and performance of the horses, it is essential to assess musculoskeletal and cardiac function during the recovery period.

In human high performance sports compiling a panel of exercise-dependent biomarkers and establishing individual reference ranges has helped to achieve the assessment of recovery status [1-9].

In horses, many different blood-based markers have recently been investigated for their suitability as exercise-dependent markers of skeletal and cardiac muscle function. Plisak et al. [10] investigated the previously less studied cytokines IL-1ra and IL-13 in comparison to the well-known anti-inflammatory cytokine interleukin 10 (IL-10) in serum concentrations during endurance and racing in horses of different fitness levels. Kirsch and Sandersen [11] examined various electrolytes in eventing horses before and after cross-country rides to analyze the acid-base balance.

In human elite sport, the specificity of a parameter for a particular metabolic process is considered less relevant than the strong dependence on exercise to qualify the parameter for performance diagnostics [1-8]. Therefore, this study examined parameters that are part of the standard repertoire of any laboratory and whose functions have already been well studied.

The enzymes creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH) and aspartate aminotransferase (AST) have long been proven to diagnose exercise-induced myopathies [12] and have also been used in many studies to assess skeletal muscle function in eventing horses before and after cross-country rides [13-17]. In humans, it is recommended to measure the enzymes CK, LDH and AST to obtain information on muscle cell damage [7, 12, 18].

One parameter that is considered a specific indicator of myocardial damage is cardiac troponin I (cTnI). However, post-exercise increases in cTnI levels are common in active horses and must be distinguished from pathological increases, as pointed out by Lippi and Sanchis-Gomar [19]. In fact, cTnI only enters the circulation when myocardial cells are under increased stress [18, 20-25]. Studies on endurance horses [26-28] reported an increase in cTnI levels after endurance rides, while Fazio et al. [29] found cTnI increases after jump training in healthy horses. Ayvazoglu et al. [30] and Pourmohammad et al. [31] found cTnI increases in arabian and thoroughbred racehorses after training. In the context of racehorses, Rossi et al. [32] demonstrated that increased cTnI concentrations and cardiac arrhythmias after racing indicate myocardial damage. Gunther-Harrington et al. [33] also described exercise-induced cTnI elevation in thoroughbred racehorses receiving furosemide. To our knowledge, this is the first study to investigate whether cTnI also increases in eventing horses after cross-country exercise.

In this study we examine whether blood-based markers for skeletal and cardiac muscle function of top-class eventing horses change post-exercise under realistic and updated competition conditions. Unlike previous studies that overlook the shift in plasma volume when analyzing blood parameters post-exercise, we propose an adjustment that enhances the interpretation of blood parameters immediately after exercise.

## 2. Materials and Methods

Riders and owners received written information about the study conditions and agreed in writing to voluntary and unremunerated participation. The study was registered with the regulatory state office of Berlin (1-02.04.40.2022.VG006) but was not classified as an animal experiment. Blood samples were taken by veterinarians who were involved in routine performance diagnostic care through the 'performance monitoring program' of the German Olympic Committee for Equestrian Sports (DOKR) project. All horses were examined clinically and via echocardiography by veterinarians of the DOKR project and declared healthy before participation.

### 2.1. Study Design

A total of eight riders with 20 horses participated in the study, which took place at 14 international 2- to 4-star level eventing competitions at 5 different venues in Germany and Poland between March and September 2022.

All horses were sampled at two to five competitions during the season, resulting in a sample count per horse ranging from four to 20. For each competition, the horses went through the mandatory veterinary checks before and after the cross-country test, which declared the horses 'fit to compete'.

#### 2.1.1. Horses

Subjects for the present longitudinal observational study were horse-rider combinations that are monitored by the 'performance monitoring program' of the German Olympic Committee for Equestrian Sports (DOKR) project.

The horses participating in the study were between seven and 15 years old, with a mean age of eleven years. The population consisted of ten mares and ten geldings. The horses belonged to nine different warmblood breeds (Table 1). Relevant information regarding the identification of the horses was obtained from FEI database [34].

**Table 1.** Age, sex, and breed of participating horses in cross-country rides.

Horse	Age	Sex	Breed
1	7	Mare	Holsteiner
2	12	Mare	Stud Book du Cheval Selle Français
3	12	Gelding	Hanoverian
4	15	Mare	Hanoverian
5	12	Gelding	Irish Sport Horse
6	14	Gelding	Hanoverian
7	9	Gelding	Hanoverian
8	10	Mare	Polish Horse Breeders Association
9	15	Mare	Rheinlander
10	9	Mare	German Sport Horse
11	7	Mare	Oldenburger
12	8	Mare	Oldenburger
13	8	Gelding	Westphalian
14	14	Gelding	Holsteiner
15	11	Gelding	Hanoverian
16	12	Mare	Hanoverian
17	10	Gelding	Irish Sport Horse
18	11	Gelding	Holsteiner
19	15	Gelding	Hanoverian
20	7	Mare	Hanoverian

### 2.1.2. Riders

The riders were aged between 21 and 39, with an average age of 28. The study included three male and five female riders. To compete at the respective test level, all riders achieved the corresponding performance levels through placings in lower classes, ensuring that they had comparable performance levels.

### 2.1.3. Training schedules

The horses were individually prepared for competition by their riders and trainers for the corresponding competition requirements. Each training plan includes dressage, jumping and cross-country training, as well as basic endurance training, days with light work and days with only paddock or pasture. The specific training schedule of each horse was neither reported nor standardized.

### 2.1.4. Exercise

An eventing competition comprises the three sub-tests dressage, jumping and cross-country. This study focuses on the cross-country test, which, depending on the test format, was either the second or the third test in the eventing competition.

Nine rides were sampled at a two-star level, 31 rides at three-star level, and 15 rides at four-star level, following the rules of the Fédération Equestre Internationale (FEI) for international eventing competitions [35]). Specific test requirements for the cross-country tests can be found in Table 2. The average score achieved in the cross-country test was 9.2 penalty points. In two rides, riders were eliminated due to horse falls, and in one ride, the rider retired. Information regarding nutrition, water intake, and additional exercise during the competition days was not recorded.

**Table 2.** Cross-country competition information, as well as distance, speed, environmental parameters, ground, and altitude profile.

Competition	Level	Week	Venue	Horses N=	Distance [m]	Speed required [m/min]	Temperature [°C]	Ground	Altitude profile	Weather
1	CCI3*-S	12	A	11	3401	550	13	normal	flat	cloudy
2	CCI3*-S	15	B	7	3007	520	16	normal	intermediate	sunny
3	CCI2*-S	16	A	2	3000	520	16	normal	flat	cloudy
4	CIC2*-L	18	C	1	3787	520	16	deep	hilly	sunny
5	CCI2*-S	18	C	2	3085	520	18	normal	hilly	cloudy
6	CCI4*-S	18	C	7	3705	570	20	deep	hilly	sunny
7	CCI4*-S	24	A	3	3772	570	29	normal	flat	sunny
8	CIC3*-L	25	A	3	4455	550	26	normal	flat	sunny
9	CCI3*-S	25	A	3	3364	550	25	normal	flat	sunny
10	CCI2*-S	30	D	2	2661	520	20	normal	hilly	cloudy
11	CCI3*-S	30	D	6	3538	550	20	normal	hilly	cloudy
12	CCI2*-S	35	E	1	3087	520	28	normal	flat	sunny
13	CCI3*-S	35	E	2	3470	550	28	normal	flat	sunny
14	CCI4*-S	35	E	5	3580	570	28	normal	flat	sunny

CCI = Concours Complet International; CIC = Concours International Combiné; "-L" = Long format; "-S" = Short format

### 2.1.5. Sampling times

Sampling times included the morning before exercise (Pre), ten minutes (10 min) and 30 minutes (30 min) after the end of exercise, and 24 hours after Pre-sample (next morning). Samples pre-exercise and the next morning were taken between 04.00 a.m. and 7.30 a.m. Due to varying start times, the 10 min and 30 min samples were collected between 09:00 a.m. and 05:00 p.m. Depending on the horses' start times, the time intervals between the Pre-samples and the samples shortly after exercise, as well as between the 30 min samples and the next morning samples, varied. The time span between 30 min post-exercise and the next morning ranged

from 11 to 21 hours, while the time span between Pre and next morning was 24 hours ( $\pm 1$  hour).

## 2.2. Sample collection

Blood samples were obtained from the horses' jugular veins, with the puncture site disinfected with 1-propanol. Venous blood sampling was performed by Vacutainer system using 20G needles and PET (polyethylene terephthalate) tubes. Following each blood collection, EDTA whole blood tubes were immediately refrigerated at + 5 °C, while serum gel tubes were maintained at room temperature for 30 to 60 minutes until clotting was complete. A portable centrifuge, type EBA 200 from Andreas Hettich GmbH & Co.KG (Tuttlingen, Germany) was used to centrifuge serum tubes at 1000  $\times$  g for 10 minutes before the serum was transferred to uncoated plastic tubes and immediately frozen at -20 °C.

### 2.2.1. Sample storage and transport to the testing laboratory

All samples were refrigerated (+5°C) or frozen (-20°C) within minutes of processing at the event site. Lactate values were determined using a BIOSEN system, and sample cups were stored at +5°C until analysis. All samples were then transported within 48 hours from the event site to the in-house laboratory of the German Equestrian Federation (FN) in Warendorf, Germany, where refrigerated EDTA whole blood and BIOSEN lactate samples were analyzed immediately. The serum samples were stored at -20°C for a maximum of 8 weeks before being transported frozen to the external testing laboratory, LABOKLIN GmbH & Co.KG. (Bad Kissingen, Germany).

### 2.2.2. Blood parameters

Blood parameters specific to cardiac and skeletal muscle, including enzymes and metabolites, were measured, along with parameters providing information about shifts in fluid balance (Table 3). Red blood cells (RBC), hematocrit (HCT), total protein (TP), albumin (Alb), urea, and symmetrical dimethylarginine (SDMA) were determined at all measurement time points. Aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), creatinine (CREA), calcium, chloride, potassium, magnesium, sodium, inorganic phosphate (Inorg. Phosphate), and cardiac troponin I (cTnI) were not determined 10 minutes post exercise but at all other measurement time points.

**Table 3.** Blood-based biomarker and associated categories.

Category	Biomarker
Fluid Balance	RBC, HCT, TP, Albumin, UREA, SDMA, Chloride, Sodium
Muscle enzymes	CK, LDH, AST
Muscle metabolites	Lactate, Creatinine, Inorg. Phosphate, Calcium, Magnesium, Potassium
Cardiac Markers	cardiac Troponin I (cTnI)

### 2.2.3. Measurement techniques

Hematology was assessed using laser flow cytometry and laminar flow impedance in a ProCyt DX hematology analyzer from IDEXX Laboratories Inc. (Westbrook, USA). Blinded serum samples were further processed in the investigation laboratory (LABOKLIN, Bad Kissingen, Germany). cTnI was measured through a chemiluminescence assay (LIA) using an ADVIA Centaur XPT 2000 (Siemens, Munich, Germany). All other blood chemistry parameters were



measured photometrically (PHO) or potentiometrically (POT) with a Cobas 8000 analyzer (Roche, Basel, Switzerland).

### 2.3. Missing values

Sample sets were complete in 54 of 55 rides. In one set, the 'next morning' sample is missing because the rider refused to take the sample in a stressful situation. In two blood collections, the serum tube was lost after collection. In one blood collection, the amount of blood was insufficient to fill all sample tubes, resulting in the absence of certain values for this measurement. Additionally, 34 lactate values are missing because no lactate sample cups were filled at the 'pre' and 'next morning' time points at the beginning of the season.

### 2.4. Data analysis

All statistical analyses were performed using Jamovi (version 2.3.21.0) [36]. Normality of data was visually assessed using box plots, histograms, and Q-Q plots. Due to non-normality, the parameters lactate, AST, calcium, CK, magnesium and potassium were log-transformed. Cardiac Troponin I (cTnI) values were log<sub>1p</sub>-transformed.

#### 2.4.1. Plasma volume loss adjustment

Blood values are reported as concentrations, inherently defined as amount per volume. During exercise, not only the quantity of the blood parameter (cell, enzyme, metabolite) changes but also the volume due to the three effects of splenic contraction, plasma volume loss, and dehydration. This means that changes in the quantity of the blood parameter can be masked or simulated. To understand the changes in individual blood parameters after exercise and draw conclusions about the function of specific systems such as the skeletal muscles, it can be helpful to separate volume effects from quantity effects.

To account for dehydration following endurance training in Arabian horses, Witkowska-Pilaszewicz et al. [37] adjusted SAA values using total protein. However, TP may not be an accurate measure for assessing the degree of intravascular plasma volume loss in horses after maximal exercise, as splenic contraction can also release additional proteins (particularly globulins) into the bloodstream Masri et al. [38].

Therefore, we propose using albumin as a marker of intravascular plasma volume loss. An increase in albumin concentration during or shortly after submaximal exercise is primarily due to plasma volume shifts [39, 40]. We adjusted values at 10 minutes and 30 minutes post-exercise, while Pre-values remained unadjusted. Next morning values were also not adjusted, assuming that albumin levels in the morning after exercise are not related to plasma shift during exercise. Each individual 10 min and 30 min value was adjusted using the formula:

$$\text{Adjusted value} = \text{Measured value}_{\text{time point } x} / (1 + \text{plasma volume loss (\%)}_{\text{time point } x}) \quad (1)$$

#### 2.4.2. Mixed model

Estimated marginal means (EMM) for each time point and parameter were calculated using a mixed model. Time Point was used as fixed effect, while "horse" nested in "rider", and "level" nested in "competition" were used as cluster variables. The normality of the residual distribution was checked using a normal likelihood plot of the residuals.

The mixed model was applied to both the observed and adjusted data sets. Estimated marginal means (+ confidence intervals) of adjusted values are

represented in figures as light gray dots with dark gray whiskers. In this study, 95 % confidence intervals were calculated, and the significance threshold was set at 5 %.

P-values given in the figures refer to change in EMM between 'Pre' and the respective time point and were calculated using the plasma shift-adjusted values. In case of albumin, p-values are calculated using the non-adjusted values. The estimated marginal means for the adjusted values of albumin show a straight line between pre and 30 minutes after exercise, which illustrates the effects of the adjustment. For cTnI, no adjusted EMM are shown in Figure 4, as they do not differ from the EMM without adjustment. The p-values for changes between time points in cTnI are also identical with and without adjustment.

We examined whether the tested parameters exhibited exercise-dependent increases or decreases, the magnitude of these changes, and how far their estimated marginal means deviated from reference ranges for healthy horses at rest. Relative changes in parameter  $EMM_{unadjusted}$  across the tested time points were calculated. We also counted the number of rides in which values outside the reference ranges, to determine if such deviations are common or potentially pathological.

### 3. Results

The observed descriptive data as well as the estimated marginal means of the unadjusted values and their 95 % confidence intervals for the respective parameters are presented in the supplements.

#### 3.1. Fluid balance related parameters

Based on the increase in albumin concentration up to 30 minutes after exercise, we calculated a reduction in intravascular plasma volume of 9.5 % ten minutes and 7.1 % 30 minutes after the end of exercise using the reported mixed model (Figure 1 a).

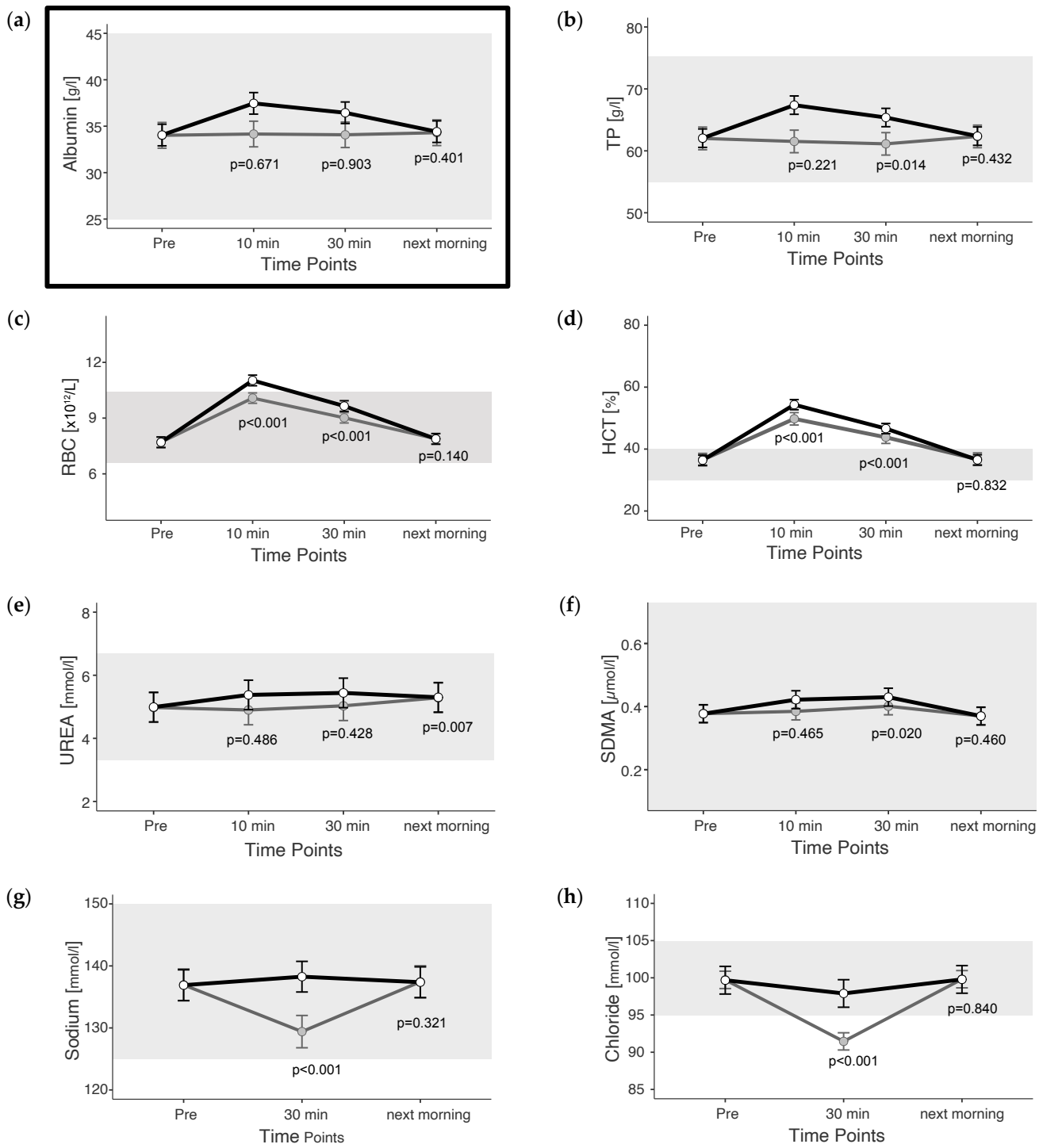
All fluid balance-related parameters peaked at the earliest measured time point post exercise (unadjusted) (Figure 1a to 1h). Exceptions were urea which slightly increased until the next morning and SDMA, which peaked 30 minutes after the end of exercise (unadjusted and adjusted) (Figure 1e and 1f). 30 minutes after the end of exercise, observed RBCs were 25 % and HCT was 28 % higher than before exercise (unadjusted). In the morning after the cross-country test, there were deviations of no more than 6 % in all fluid balance related parameters compared to "Pre" exercise.

#### 3.2. Muscle enzymes

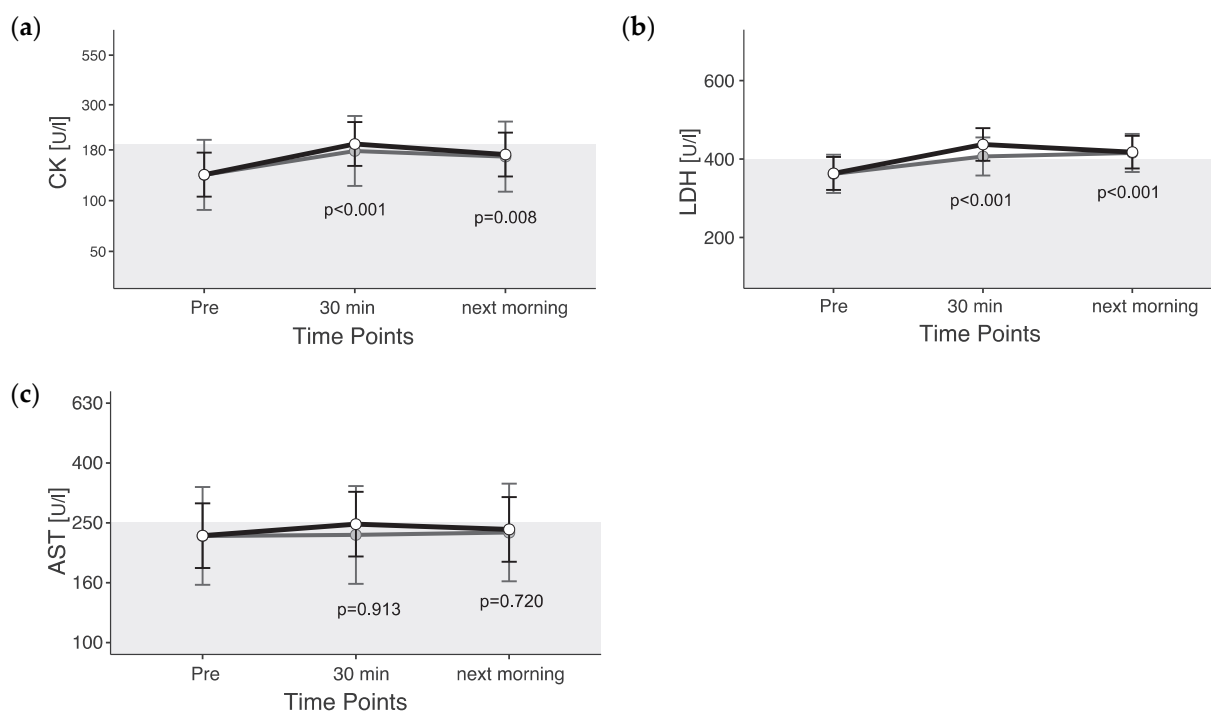
The maximum value for CK was 537 U/l, measured 30 minutes after exercise. CK reached values above the reference in 47 % of the rides and the CK changes were significant due to exercise ( $p < 0.05$ ). 30 minutes after the end of exercise, CK levels were above the reference range (unadjusted) (Figure 2 a). CK levels 30 minutes after exercise were 45 % higher and the next morning 26 % higher than pre-exercise (unadjusted).

LDH was 676.6 U/l in maximum, measured the next morning after cross-country. In 73 % of the rides LDH increased above the reference range. LDH changed significant due to exercise ( $p < 0.05$ ). 30 minutes after the end of exercise and the next morning, LDH levels were above the reference range (unadjusted) (Figure 2 b). LDH levels were 20 % higher 30 minutes after exercise and 15 % higher the next morning than before exercise (unadjusted).

Maximum AST was 512.2 U/l, measured the next morning after cross-country. AST reached values above the reference range in 44 % of the rides. AST exceeded the current reference range only 30 minutes after exercise, if plasma volume loss is not considered. If plasma volume loss is considered, AST does not change between the time points of the measurement ( $p = 0.934$ ) (Figure 2 c).



**Figures 1 a - h** Estimated marginal means (EMM) (white dots) and their 95 % confidence intervals (black whiskers) of fluid balance blood parameters at measured time points. Gray dots and whiskers represent EMM and 95 % confidence intervals when 10 and 30 minutes post-exercise values were adjusted for plasma shift. P-values apply to the difference between Pre and the respective time point. Y-axis is scaled according to the observed scores. The gray box symbolizes the current reference range for healthy horses at rest of the related blood parameter. In case of Albumin p-values were not adjusted to show the evidence of the adjustment. N=55.



**Figures 2 a - c** Estimated marginal means (EMM) (white dots) and their 95 % confidence intervals (black whiskers) of muscle enzymes at measured time points. Gray dots and whiskers represent EMM and 95 % confidence intervals when 10 and 30 minutes post-exercise values were adjusted for plasma shift. P-values apply to the difference between Pre and the respective time point. Y-axis is scaled according to the observed scores. The gray box symbolizes the current reference range for healthy horses at rest of the related blood parameter. N=55.

### 3.3. Muscle metabolites

The maximum measured lactate value was 27.92 mmol/l, measured 10 min post-exercise. Lactate was above the reference range in 100 % of the rides at least at the earliest measured time point post exercise. Lactate changed significantly due to exercise ( $p < 0.05$ ). The lactate level 10 minutes after the end of exercise were 14 times (1293 % increase) and 30 minutes after exercise still 5.5 times (453 % increase) higher than before exercise (unadjusted) (Figure 3 a).

The range of measured Creatinine (64 to 167  $\mu\text{mol/l}$ ) values was close to the reference range. Creatinine changed due to exercise ( $p < 0.05$ ). Creatinine was 31 % higher 30 minutes post exercise and 5 % higher the next morning than before exercise ( $p < 0.01$ ) (unadjusted) (Figure 3 b).

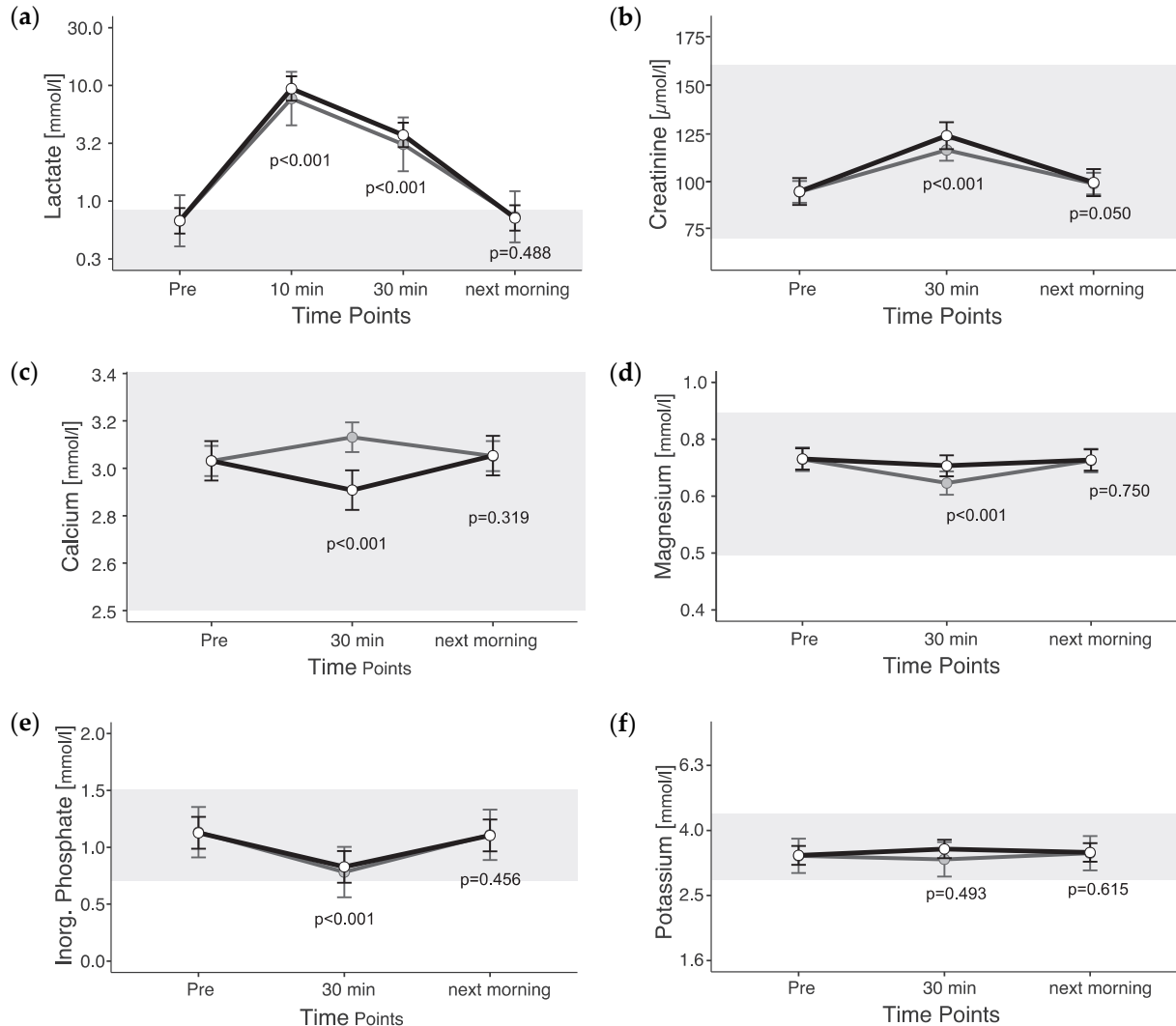
Calcium values ranged between 2.7 and 3.3 mmol/l and the changes due to exercise were significant ( $p < 0.05$ ). Unadjusted calcium showed an increase of 3 % 30 minutes after the end of exercise (unadjusted) (Figure 3 c), but the adjusted values were lower 30 min after exercise than pre-exercise.

Magnesium values ranged from 0.5 to 0.9 mmol/l. Magnesium changed due to exercise ( $p < 0.05$ ). Unadjusted magnesium is 3% lower 30 minutes after the end of exercise (unadjusted) (Figure 3 d).

Inorganic phosphate was measured between 0.4 and 1.8 mmol/l. The changes were significantly due to exercise ( $p < 0.05$ ). Inorganic phosphate displayed values below the reference range in 11 rides (20 %; n=55) 30 minutes post exercise. Inorganic phosphate shows a decrease of 26 % 30 minutes post-exercise (unadjusted) (Figure 3 e).

The range of measured potassium was 1.8 to 7.9 mmol/l. Potassium was below the reference range in 16 rides (29 %; n=55) at different time points. Potassium showed no significant change due to exercise ( $p=0.485$ ).

The next morning, only deviations of no more than 2 % from the pre-value were measurable in electrolytes calcium, magnesium, Inorg. phosphate and potassium.



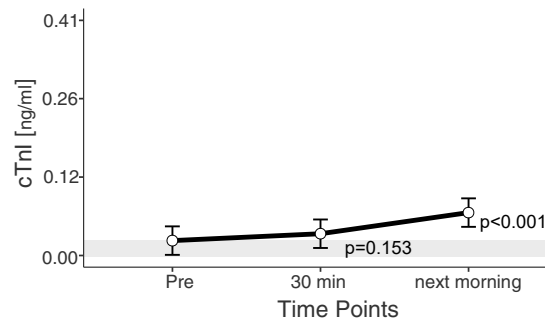
**Figures 3 a - f** Estimated marginal means (EMM) (white dots) and their 95 % confidence intervals (black whiskers) of muscle metabolites at measured time points. Gray dots and whiskers represent EMM and 95 % confidence intervals when 10 and 30 minutes post-exercise values were adjusted for plasma shift. P-values apply to the difference between Pre and the respective time point. Y-axis is scaled according to the observed scores. The gray box symbolizes the current reference range for healthy horses at rest of the related blood parameter. N=55.

### 3.4. Cardiac markers

For all horses examined, cTnI values above the reference range were measured in 40 of 55 rides (73.0 %). Mean cTnI-concentrations increased continuously between "Pre" and "next morning". With an estimated marginal mean of 0.07 ng/ml (0.04; 0.09 ng/ml), next morning values exceeded the reference range (<0.03 ng/ml) (Figure 4).

The highest troponin value measured was 0.41 ng/ml and was measured the morning after a cross-country test. The highest value measured prior to start was 0.19 ng/ml and 0.25 ng/ml 30 minutes after end of the exercise. The maximum values

belonged to one horse in one ride at the beginning of the season. This horse had troponin I values above the reference range in 8 of 8 samples. The average percentage increase between pre-value and next morning value is the same for this horse as for the other horses (2.5-fold increase), with a mean delta cTnI between “Pre” and “next morning” of 0.15 ng/ml. Clinically and echocardiographically, no signs of heart disease were detected in this horse before and during the season, prior and after each competition. In the cross-country tests, this horse's score ranged from 0.0 to 9.2 penalty points.



**Figure 4.** Estimated marginal means (EMM) (white dots) and their 95 % confidence intervals (black whiskers) of cTnI at measured time points. P-values apply to the difference between Pre and the respective time point. Y-axis is scaled according to the observed scores. The gray box symbolizes the current reference range for healthy horses at rest. Blue dots show the observed values. N=55.

#### 4. Discussion

Muscle enzymes, muscle metabolites and cardiac markers show exercise-dependent changes, with and without considering shifts in plasma volume. Shortly after exercise, both muscle enzymes and muscle metabolites show deviations from the pre-values. In the morning after exercise, the muscle enzymes CK and LDH are still significantly elevated, but compared to 30 min post exercise they decreased already. There is a significant cTnI increase in eventing horses following cross-country exercise.

##### 4.1. Fluid balance

There are three major effects that influence fluid balance during and after exercise.

First, splenic contraction releases additional red blood cells into the bloodstream to increase oxygen-carrying capacity, which increased HCT during exercise up to 10 % in intact and splenectomised horses in an incremental treadmill exercise test [41]. Even though the cross-country ride represents a submaximal exercise, 17.9 % HCT increase ten minutes after exercise was observed in the eventing horses of the present study, suggesting that either the capacity of the storage spleen is even greater than estimated by McKeever et al. [41], or that the HCT was additionally increased by plasma volume loss. Since plasma volume loss was estimated to be 9.5 % (10 min post exercise) using albumin, which is little affected by splenic contraction [41], the difference in HCT increase is 8.4 %, consistent with literature data on splenic contraction [38, 42].

Second, there is a plasma volume shift from intravascular to extravascular space because hydrostatic pressure increases during exercise [38, 40, 42, 43]. In the present study TP and Alb increased during exercise by about as much as Masri et al. [38] and McKeever et al. [42] calculated for intravasal plasma volume loss during maximal exercise 30 years ago. Masri et al. [38] calculated 13 % plasma volume loss

within the first ten minutes after the end of 1000 m maximal exercise using blood chemical values like plasma protein and electrolytes. McKeever et al. [41], [42] calculated plasma volume loss of 5 to 10 % during exercise in splenectomised and intact horses. While most descriptive studies do not adjust for plasma volume shifts during exercise [40, 43, 44], Witkowska-Pilaszewicz et al. [37] adjusted SAA values by using total protein. The adjustment of individual values in an observational study may give the impression of a distorted representation of the data. In our opinion, the applied plasma volume shift adjustment is rather a plasma volume standardization that allows an unmasked view on the changes in parameter amounts. It seems reasonable to take massive fluid shifts into account, especially if you want to understand the equine physiology after exercise.

Third, fluid loss (dehydration) occurs through sweating and breathing [40, 45]. Electrolyte values (sodium, chloride), adjusted for plasma volume shift shortly after exercise reflect this electrolyte loss [44, 45]. Compared to endurance competitions, sodium and chloride decreases are less relevant in eventing horses, which could be due to the substantially shorter exercise duration of eventing rides. But the adjustment for plasma volume shift reveals that the concentrations do change and that the horses must compensate for these shifts.

To account for these three effects, the adjustment was developed, and the p-values were recalculated. Since the purpose of the adjustment was to compensate for albumin changes, and albumin is the main component of the TP, it was reasonable to conclude that the adjusted EMM of albumin and TP 10 min and 30 min after the end of exercise were unchanged compared to pre and the changes were not statistically significant ( $p > 0.05$ ).

The slight increase in renal values of UREA and SDMA could be explained by the increased production of waste products during exercise from the skeletal muscles and due to the increased metabolism [44]. In addition, renal excretion could be slightly reduced due to plasma shift and fluid loss during exercise compared to the resting state of the horse.

While SDMA concentration in the study by Riccioni et al. [46] was significantly reduced by physical exercise, which speaks for a reduced NO-forming capacity, Nyborg et al. [47] showed increased SDMA concentrations after extreme marathons in humans, which were considered a risk factor for arteriosclerosis. In the present study, neither positive effects of exercise on mean values nor alarming individual values were observed.

The analysis of the fluid balance parameters shows the influence of the physiological effects of spleen contraction, plasma volume shift, and dehydration. Since the concentrations of plasma solutes can be influenced by plasma volume loss [40, 42, 44], an adjustment was made.

There were exercise-dependent changes in the fluid balance of eventing horses following cross-country exercise. Compared with other studies using maximal high-intensity exercise [38, 40-42] our study found similar effects due to splenic contraction. Compared to studies on endurance rides [37, 43], we also found evidence of plasma volume shifts during cross-country exercise, but the amount of fluid loss through sweating and respiration is likely to be less in eventing horses because of the much shorter duration of exercise.

#### 4.2. Muscle enzymes

AST did not increase significantly due to exercise. However, trained eventing horses have higher AST values than clinically healthy horses, which were used to create the reference ranges. On EclinPath [39] it is described that highly trained horses have up to 30 % higher AST serum activity at rest and that resting levels in early training are even 50 to 100 % higher than in horses without training [39]. Therefore, resting AST levels could be an interesting factor in detecting training effects in a longitudinal evaluation. Reasons for the increased AST baseline values

might be continuous muscle stress due to physical exertion. This is contradicted by the fact that the physical stress varies, but the AST values were elevated in a very stable manner. Another possible reason for the increased AST baseline values might be an overall increased muscle metabolism, which could be caused by larger muscle mass or an altered composition of the muscle mass respectively an altered metabolism of the muscle mass.

CK showed a significant maximum increase to 215 U/l (mean) 30 min after the end of exercise. Almost 30 years ago, when eventing competitions were structured differently, and training monitoring was not yet professionalized, CK values of 1465.8 U/l on average were measured 10 min after the end of the cross-country phase [17]. At that time the 'roads and tracks' and the 'steeplechase' phase still existed, which made the total distance of cross-country rides substantially longer [16]. This shows that the muscle fiber damage of eventing horses seems to have decreased significantly over the decades, which could be due to the reduction of test requirements on the one hand and the significantly improved training monitoring and exercise scheduling on the other hand.

Thoroughbred racehorses, examined by Arfuso et al. [48], Arfuso et al. [48] had comparable CK values and lower LDH values 30 min after 1200 m to 2000 m gallop races, which may indicate a higher training status in these horses. However, in contrast to the cross-country course, the length of the racetrack is shorter, the speed is higher, and there are no jumps.

LDH values 30 minutes after exercise in the present study (LDH<sub>30 min</sub>: 437 (395;479) U/l) were about the same as those of trained purebred Arabian racehorses (417 ± 28.20 U/l) in daily training (2000 m gallop) evaluated by Kowalik and Tomaszewska [49]. The next morning, LDH levels in the present study did not drop to pre-values, which was the case in the purebred Arabian racehorses [49].

Lactate values were lower in the purebred Arabian racehorses (immediately after exercise: 4.64 ± 3.14 mmol/l) than in the cross-country horses (10 min post exercise 8.53 U/l (4.89 - 12.00 mmol/l)).

Since LDH is responsible for the lactate breakdown in the cell [50], it is reasonable to assume that the prolonged LDH accumulation is related to the higher amount of lactate. However, it should be considered that the higher amount of lactate increases the LDH activity, but not necessarily the measurable amount of LDH in the blood. This could also be due to a prolonged increase in cell membrane permeability. The comparability of the two studies is nevertheless questionable, as exercise differed between the studied rides.

CK and LDH showed significant increases the next morning, although the enzyme levels decreased compared to the 30 min values.

The maximum CK and LDH-values measured in the present study (CK 537 U/l; LDH 676.6 U/l) are quite far from the threshold values of exercise-induced myopathies. In cases of tying up syndrome, which is the mildest described form of exercise-induced myopathies, CK values up to 2000 U/l, LDH values up to 1500 U/l are measured [12].

To evaluate the sustained increase of the muscle enzymes CK and LDH in the morning after exercise, the slow clearance should be taken into account, which corresponds to a half-life of 9.4 ± 5.7 hours for CK [51] and a half-life of 7.65 hours [52] for LDH. Accordingly, the slight persistence of CK and LDH in the blood is attributable to slow excretion rather than sustained release.

Muscle enzymes CK and LDH show exercise-dependent increases above the limit of the reference range following cross-country exercise. However, compared to exercise-induced myopathies, other equine disciplines, and former eventing competitions, the percentage increases are small, and values already decrease within one night. The slight persistence of CK and LDH in the blood is attributable to slow excretion rather than sustained release.



#### 4.3. Muscle metabolites

Muscle metabolites respond differently; lactate shows strong increases but does not appear to be associated with severe muscle fiber damage, as muscle enzymes show only small increase.

Creatinine may originate from the muscles [53-56], as creatinine is a side product of an energy-providing reaction in the muscles. McKeever et al. [57] and Hinchcliff et al. [58] found that glomerular filtration rate and filtration fraction do not change in horses during submaximal exercise. Thus, the creatinine increase observed in our study is most likely not due to altered renal function.

All muscle metabolites except potassium were significantly altered by exercise. Electrolytes such as calcium, magnesium, inorganic phosphate, and potassium may be lost through sweat [59-61]. The changes in the amount of electrolytes can also reflect adaptations in acid-base balance. Concentrations of electrolytes like potassium are physiologically strongly regulated and deviations of these parameters in individual animals should attract attention as they may be signs of severe exertion.

Inorganic phosphates drop 30 minutes after exercise. An accumulation of inorganic phosphates in the muscles, which seems to contribute to peripheral fatigue [62], could be related to a drop in concentration in the blood, although only small amounts of inorganic phosphate circulate in the blood [62-65]. It could be hypothesized that the plasma dissolved inorganic phosphate is used to produce Adenosine-Triphosphate (ATP) by phosphorylation and the breakdown products then accumulate in the muscle cells causing fatigue [63]. However, increased muscular work under stress is known to cause acidification, which would spill over into the bloodstream if not buffered by physiological systems [66]. The inorganic phosphate plays a role here, as it binds  $H^+$  in the proximal renal tubules, thus changing from  $HPO_4^-$  into  $H_2PO_4^-$  which cannot be absorbed and is excreted, contributing to the buffering of the accumulating  $H^+$  ions [66].

The significant increase in lactate levels with a minimal increase in muscle enzymes suggests that the horses tested showed no signs of muscle damage even though large amounts of lactate accumulated. Blood lactate levels reflect a delicate balance between lactate production in muscles and lactate consumption by oxidative metabolism, particularly in oxidative muscle fibers [66]. The current view is that lactate is not simply a waste product of anaerobic metabolism [50]. In trained individuals, both humans and horses, lactate serves various functions in aerobic metabolism during periods of exercise [50]. However, the accumulation of lactate in the blood indicates that the proportion of anaerobic energy production in the muscles is significantly increased and exceeds the capacity for lactate consumption [66]. Nevertheless, horses appear to be able to withstand this stress, possibly due to training, without evidence of muscle damage.

Muscle metabolites show different responses post exercise. The increases in lactate and creatinine are attributable to the increased muscle metabolism. The changes in electrolyte amounts only become apparent through plasma shift adjustment. Recovery was such that all muscle metabolites are restored to baseline levels by the following morning in the majority of horses studied.

#### 4.4. Cardiac markers

The increase in cTnI indicates cardiac fatigue in eventing horses after cross-country riding due to increased release of cTnI from cardiomyocytes [20, 21]. Reasons for this, besides myocardial damage, could be increased cell membrane permeability because of changes in oxygen tension or local pH during exercise [67, 68].

To identify myocardial damage, measurements at several time points after exercise are necessary to assess how long the cTnI release lasts. Sustained cTnI release over several days is indicative of myocardial damage, while rapidly decreasing cTnI release is indicative of a physiological process [21, 24]. In humans,

literature reports a release pattern in which the rise and peak occur within the first four hours after physical exercise [21, 24]. If myocardial necrosis occurs, the peak occurs later (about 8 hours post exercise), and the decline does not occur in the first 24 hours but over several days [21, 24]. A distinction between a physiological increase and myocardial necrosis is not possible in this study setting, as the peak cTnI value is expected at least four hours after exercise, and in the present study, no measurements could be taken between 30 minutes after exercise and the next morning.

The maximum value of 0.41 ng/ml measured in this study is higher than the maximum value of 0.00964 ng/ml measured in clinically healthy racehorses 2 h after the race by Rossi et al. [32].

In endurance horses after 120-160 km races, Ertelt et al. [28] measured a maximum value of 8.2 ng/ml, which is more than 20-fold higher than the maximum value measured in this study.

Flethøj et al. [43] calculated a mean cTnI value of 0.010 ng/ml 45 min to 3 h post-race and 0.005 ng/ml the following morning (10 to 14 h post-race) in endurance horses.

However, in Rossi et al. [32] no sample was taken later than 2 h after the race and in Flethøj et al. [27], Rossi et al. [32] and in our study the peak was not measured after 4 h.

Only Gunther-Harrington et al. [33] measured 4 h after the race in racehorses and reported a range of 0.00 to 0.07 ng/mL and 0.00 to 0.05 ng/mL for 24 h after the race, which are therefore comparable to the values measured the next morning in this study.

The different maximum values and ranges reported by Rossi et al. [32], Ertelt et al. [28], Flethøj et al. [43] and our study may be related to the time of measurement and the type of exercise.

The maximum cTnI values of 0.19 ng/ml before, 0.025 ng/ml 30 min after and 0.41 ng/ml the next morning observed in one horse at one competition at the beginning of the season in our study exceeded the reference ranges for healthy horses at rest and after exercise summarised by [69]. The ranges for cTnI compiled by [69] for horses with heart disease are very wide and include the maximum values measured in the present study. However, values are given for horses with heart disease that exceed the maximum measured in this study by a factor of 10 to 100.

Trachsel et al. [70] measured lower maximum cTnI values in healthy horses and horses with mitral valve insufficiencies in a submaximal exercise test on the treadmill than in the current study. This supports the assumption that more release of cTnI, i.e. greater cardiac fatigue, occurs when anaerobic exercise is performed. Also Eijsvogels et al. [71] provide evidence that the magnitude of the increase in cTnI is to some extent related to exercise intensity.

In summary, an exercise-dependent increase in cTnI concentration was observed in eventing horses. This elevations may be physiological [69, 72], but should induce appropriate follow-up examinations, especially if accompanied by symptoms such as weakness, poor performance, dyspnea or syncope [69, 73].

#### 4.5. Muscle and cardiac fatigue

Fatigue is formally defined as a state in which the capacity of striated muscles to generate force diminishes under sustained stimulation [74]. However, it is important to note that fatigue extends beyond striated skeletal muscles and is a multifaceted phenomenon influenced by both peripheral and central factors [75-77]. Cardiac fatigue, on the other hand, is characterized by transient alterations in heart muscle performance that may be linked to myocardial cell damage [78]. In our current context, cardiac fatigue is classified as pathological only when accompanied by evidence of myocardial necrosis [24].

The increase in cTnI levels observed following cross-country exercise reflects changes in the cellular function of cardiomyocytes, which we posit aligns with the concept of cardiac fatigue. Notably, the definition of cardiac fatigue does not inherently necessitate the presence of myocardial necrosis, a finding that was not detected in our study. Consequently, we interpret the elevated cTnI levels we measured as an indication of a physiological manifestation of cardiac fatigue.

#### 4.6. Limitations

To really assess the kinetics of different blood parameters, especially cTnI, several blood samples at later time points would have been necessary [79], which, however, was not feasible for organizational reasons and not justifiable for animal welfare reasons.

The varying time span between 30 min post exercise and the next morning (11 to 21 hours) is likely to influence the results. The kinetics of muscle enzymes and cTnI suggest higher levels 11 hours after exercise than 21 hours after exercise.

The selection of blood parameters was limited to established parameters. This means that the organ systems muscle and heart were not examined in an all-encompassing manner [18, 69]. A limitation of this study was the number of horses, which was too small to establish reference values according to the American Society for Veterinary Clinical Pathology guidelines for determining reference intervals in animal species [80]. A major limitation of the study is that the statistical evaluation does not go beyond the level of the mean values and thus is not capable of identifying the horses that deviate from these mean values. Nevertheless, this study provides an important basis for an individualized assessment.

## 5. Conclusions

In conclusion, relevant changes in almost all muscle enzymes and muscle metabolites occurred within 30 minutes after the cross-country test. After one night of recovery, only urea, CK, LDH and cTnI were significantly increased, while the other parameters returned to pre-exercise values. The adjustment based on albumin concentration conclusively elucidated the impact of plasma volume loss on changes in blood-based markers, as demonstrated in our study. The reported cTnI increase suggests the presence of cardiac fatigue in eventing horses, but myocardial damage was not detected. To assess whether cTnI increases indicate a pathological state, multiple post-exercise cTnI measurements and echocardiographic examinations, including myocardial function measurements, are required.

**Author Contributions:** Conceptualization: K.K., S.H., H.G.; methodology: K.K., S.H., H.G.; software: A.B.; validation: A.B., K.K., S.F.M., H.G.; formal analysis: A.B. and J.G.; investigation: J.G.; resources: K.K., S.F.M., H.G.; data curation: A.B., J.G.; writing—original draft preparation: J.G.; writing—review and editing: K.K., A.B., S.F.M., S.H., H.G.; visualization: A.B., J.G.; supervision: H.G.; project administration: H.G.; funding acquisition, K.K., H.G.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Bundesinstitut für Sportwissenschaften (BISp), ZMVI4-070101\_16-17.

**Institutional Review Board Statement:** The study was registered by the regulatory state office of Berlin (1-02.04.40.2022.VG006) but was not classified as an animal experiment.

**Informed Consent Statement:** Riders and owners received written information about the study conditions and agreed in writing to voluntary and unremunerated participation of their horses.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank the DOKR for their support.

**Conflicts of Interest:** S.F.M. is employed at the contributing commercial veterinary diagnostics laboratory LABOKLIN GmbH & Co KG (Bad Kissingen, Germany) as head of research and development of the department of clinical pathology but had no role in the design of the study, in the collection of samples, interpretation of data or in the decision to publish the results.

## References

1. Hecksteden, A., Kraushaar, J., Scharhag-Rosenberger, F., Theisen, D., Senn, S., and Meyer, T., Individual response to exercise training - a statistical perspective. *J Appl Physiol*, **2015**. 118(12): p. 1450-1459. DOI: 10.1152/jappphysiol.00714.2014.
2. Hecksteden, A., Pitsch, W., Julian, R., Pfeiffer, M., Kellmann, M., Ferrauti, A., and Meyer, T., A New Method to Individualize Monitoring of Muscle Recovery in Athletes. *Int. J. Sports Physiol. Perform.*, **2017**. 12(9): p. 1137-1142. DOI: 10.1123/ijsp.2016-0120.
3. Julian, R., Meyer, T., Fullagar, H.H., Skorski, S., Pfeiffer, M., Kellmann, M., Ferrauti, A., and Hecksteden, A., Individual Patterns in Blood-Borne Indicators of Fatigue-Trait or Chance. *J. Strength Cond. Res.*, **2017**. 31(3): p. 608-619. DOI: 10.1519/jsc.0000000000001390.
4. Hecksteden, A. and Meyer, T., Personalized Sports Medicine – Principles and tailored implementations in preventive and competitive sports. *Dtsch Z Sportmed*, **2018**. 2018: p. 73-80. DOI: 10.5960/dzsm.2018.323.
5. Hecksteden, A., Pitsch, W., Rosenberger, F., and Meyer, T., Repeated testing for the assessment of individual response to exercise training. *J Appl Physiol (1985)*, **2018**. 124(6): p. 1567-1579. DOI: 10.1152/jappphysiol.00896.2017.
6. Barth, V., Käsbauer, H., Ferrauti, A., Kellmann, M., Pfeiffer, M., Hecksteden, A., and Meyer, T., Individualized Monitoring of Muscle Recovery in Elite Badminton. *Front. Physiol.*, **2019**. 10: p. 778. DOI: 10.3389/fphys.2019.00778.
7. Hacker, S., Reichel, T., Hecksteden, A., Weyh, C., Gebhardt, K., Pfeiffer, M., Ferrauti, A., Kellmann, M., Meyer, T., and Krüger, K., Recovery-Stress Response of Blood-Based Biomarkers. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **2021**. 18(11): p. 5776. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph18115776>.
8. Kellmann, M., Bertollo, M., Bosquet, L., Brink, M., Coutts, A.J., Duffield, R., Erlacher, D., Halson, S.L., Hecksteden, A., Heidari, J., Kallus, K.W., Meeusen, R., Mujika, I., Robazza, C., Skorski, S., Venter, R., and Beckmann, J., Recovery and Performance in Sport: Consensus Statement. *Int. J. Sports Physiol. Perform.*, **2018**. 13(2): p. 240-245. DOI: 10.1123/ijsp.2017-0759.
9. Delsmann, M.M., Stürznickel, J., Amling, M., Ueblacker, P., and Rolvien, T., [Musculoskeletal laboratory diagnostics in competitive sport]. *Orthopade*, **2021**. 50(9): p. 700-712. DOI: 10.1007/s00132-021-04072-1.
10. Plisak, U., Szczepaniak, J., Żmigrodzka, M., Giercuskiewicz-Hecold, B., and Witkowska-Piłaszewicz, O., Changes in novel anti-inflammatory cytokine concentration in the blood of endurance and race horses at different levels of training. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **2023**. 21: p. 418-424. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.12.016>.
11. Kirsch, K. and Sandersen, C., Traditional and quantitative analysis of acid-base and electrolyte imbalances in horses competing in cross-country competitions at 2-star to 5-star level. *J. Vet. Intern. Med.*, **2020**. 34(2): p. 909-921. DOI: 10.1111/jvim.15708.
12. Brehm, W., Gehlen, H., Ohnesorge, B., Wehrend, A., Dietz, O., Huskamp, B., and Bartmann, C.P., eds. *Handbuch Pferdepraxis*. 4., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage ed. 2017, Enke Verlag: Stuttgart. 1239 Seiten.
13. Williams, C.A. and Burk, A.O., Antioxidant status in elite three-day event horses during competition. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2012**. 2012: p. 572090. DOI: 10.1155/2012/572090.
14. Lejeune, J.P., Sandersen, C., Votion, D., Caudron, I., Vander Heyden, L., Franck, T., Ceusters, J., Mouithys-Mickalad, A., Niesten, A., De La Rebière de Pouyade, G., and SerTEYN, D., Effect of intensive exercise on plasmatic neutrophil elastase level in eventing and endurance horses. *Equine Vet. J. Suppl.*, **2010**(38): p. 12-6. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2010.00242.x.
15. Art, T., Franck, T., Gangl, M., Votion, D., Kohnen, S., Deby-Dupont, G., and SerTEYN, D., Plasma concentrations of myeloperoxidase in endurance and 3-day event horses after a competition. *Equine Vet. J. Suppl.*, **2006**(36): p. 298-302. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2006.tb05557.x.
16. Marlin, D.J., Harris, P.A., Schroter, R.C., Harris, R.C., Roberts, C.A., Scott, C.M., Orme, C.E., Dunnett, M., Dyson, S.J., and Barrelet, F., Physiological, metabolic and biochemical responses of horses competing in the

- speed and endurance phase of a CCI\*\*\*\*3-day-event. *Equine Vet. J. Suppl.*, **1995**(20): p. 37-46. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1995.tb05006.x.
17. Andrews, F.M., Geiser, D.R., White, S.L., Williamson, L.H., Maykuth, P.L., and Green, E.M., Haematological and biochemical changes in horses competing in a 3 Star horse trial and 3-day-event. *Equine Vet. J. Suppl.*, **1995**(20): p. 57-63. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1995.tb05009.x.
  18. Mair, J., Jaffe, A., Apple, F., and Lindahl, B., Cardiac Biomarkers. *Dis. Markers*, **2015**. 2015: p. 1-3. DOI: 10.1155/2015/370569.
  19. Lippi, G. and Sanchis-Gomar, F., Cardiac troponins in diagnostics of equine myocardial injury. *J. Lab. Precis. Med.*, **2020**. 5.
  20. Alpert, J.S., Thygesen, K., Antman, E., and Bassand, J.P., Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2000**. 36(3): p. 959-969. DOI: 10.1016/s0735-1097(00)00804-4.
  21. Baker, P., Leckie, T., Harrington, D., and Richardson, A., Exercise-induced cardiac troponin elevation: An update on the evidence, mechanism and implications. *Int J Cardiol Heart Vasc*, **2019**. 22: p. 181-186. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2019.03.001>.
  22. O'Brien, P.J., Smith, D.E., Knechtel, T.J., Marchak, M.A., Pruiomboom-Brees, I., Brees, D.J., Spratt, D.P., Archer, F.J., Butler, P., Potter, A.N., Provost, J.P., Richard, J., Snyder, P.A., and Reagan, W.J., Cardiac troponin I is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *Lab. Anim.*, **2006**. 40(2): p. 153-71. DOI: 10.1258/002367706776319042.
  23. Phillips, W., Giguère, S., Franklin, R.P., Hernandez, J., Adin, D., and Peloso, J.G., Cardiac troponin I in pastured and race-training Thoroughbred horses. *J. Vet. Intern. Med.*, **2003**. 17(4): p. 597-9. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2003.tb02486.x.
  24. Tjora, S., Gjestland, H., Mordal, S., and Agewall, S., Troponin rise in healthy subjects during exercise test. *Int. J. Cardiol.*, **2011**. 151(3): p. 375-376. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2011.06.106>.
  25. Gehlen, H., Rohn, K., Deegen, E., and Stadler, P., Analysis of laboratory values in horses with cardiac disease: Diagnostic value of different cardiac biomarkers. *Pferdeheilkunde*, **2006**. 22: p. 532-541. DOI: 10.21836/PEM20060503.
  26. Holbrook, T.C., Birks, E.K., Sleeper, M.M., and Durando, M., Endurance exercise is associated with increased plasma cardiac troponin I in horses. *Equine Vet. J. Suppl.*, **2006**(36): p. 27-31. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2006.tb05508.x.
  27. Flethøj, M., Kanters, J.K., Haugaard, M.M., Pedersen, P.J., Carstensen, H., Balling, J.D., Olsen, L.H., and Buhl, R., Changes in heart rate, arrhythmia frequency, and cardiac biomarker values in horses during recovery after a long-distance endurance ride. *J Am Vet Med Assoc*, **2016**. 248(9): p. 1034-42. DOI: 10.2460/javma.248.9.1034.
  28. Ertelt, A., Merle, R., Stumpff, F., Bollinger, L., Liertz, S., Weber, C., and Gehlen, H., Evaluation of Different Blood Parameters From Endurance Horses Competing at 160 km. *J. Equine Vet. Sci.*, **2021**. 104. DOI: 10.1016/j.jevs.2021.103687.
  29. Fazio, F., Aragona, F., Piccione, G., Pino, C., and Giannetto, C., Cardiac Biomarker Responses to Acute Exercise in Show Jumping Horses. *J. Equine Vet. Sci.*, **2023**. 128: p. 104882. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2023.104882>.
  30. Ayvazoglu, C., Kiziltpe, S., Yaşar, Ü., Yaşar, Z., Demir, P., and Tunc, A., Changes in cardiac troponin I (cTnI), T (cTnT), and some biochemical parameters in Arabian racehorses after training. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, **2023**. 53(1): p. 1-6.
  31. Pourmohammad, R., Mohri, M., Seifi, H.A., and Sardari, K., Evaluation of cardiac troponin I, atrial natriuretic peptide and some oxidative/antioxidative biomarkers in the serum and hemolysate of trained Arabian horses after exercise. *Iran J Vet Res*, **2020**. 21(3): p. 211-215, IPMC7608043.
  32. Rossi, T.M., Kavsak, P.A., Maxie, M.G., Pearl, D.L., Pyle, W.G., and Physick-Sheard, P.W., Effect of racing on cardiac troponin I concentration and associations with cardiac rhythm disturbances in Standardbred racehorses. *J. Vet. Cardiol.*, **2021**. 35: p. 14-24. DOI: 10.1016/j.jvc.2021.02.002.
  33. Gunther-Harrington, C.T., Arthur, R., Estell, K., Martinez Lopez, B., Sinnott, A., Ontiveros, E., Varga, A., and Stern, J.A., Prospective pre- and post-race evaluation of biochemical, electrophysiologic, and echocardiographic indices in 30 racing thoroughbred horses that received furosemide. *BMC Vet. Res.*, **2018**. 14(1). DOI: 10.1186/s12917-018-1336-0.
  34. Fédération Equestre Internationale FEI Database. Available from: <https://data.fei.org/Horse/Search.aspx>.
  35. Fédération Equestre Internationale. Available from: <https://inside.fei.org/fei/disc/eventing/rules>.
  36. The jamovi project (2022) jamovi (Version 2.3) [Computer Software]. Available from: <https://www.jamovi.org>.

37. Witkowska-Pilaszewicz, O., Baška, P., Czopowicz, M., Żmigrodzka, M., Szczepaniak, J., Szarska, E., Winnicka, A., and Cywińska, A., Changes in serum amyloid a (SAA) concentration in Arabian endurance horses during first training season. *Animals*, **2019**. 9(6): p. 330. DOI: 10.3390/ani9060330.
38. Masri, M., Freestone, J.F., Wolfsheimer, K.J., and Shoemaker, K., Alterations in plasma volume, plasma constituents, renin activity and aldosterone induced by maximal exercise in the horse. *Equine Vet. J. Suppl.*, **1990**(9): p. 72-7. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1990.tb04739.x.
39. EclinPath. Available from: <https://eclinpath.com/>.
40. Assunção, P., Barbosa, T., Yonezawa, L., Barbosa, L., Watanabe, M., Kohayagawa, A., and Schmidt, E., Acute-phase protein profile in horses subjected to different exercise protocols. *Can J Vet Res*, **2019**. 83(4): p. 272-278, IPMC6753884.
41. McKeever, K.H., Hinchcliff, K.W., Reed, S.M., and Robertson, J.T., Plasma constituents during incremental treadmill exercise in intact and splenectomised horses. *Equine Vet. J.*, **1993**. 25(3): p. 233-6. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1993.tb02950.x.
42. McKeever, K.H., Hinchcliff, K.W., Reed, S.M., and Robertson, J.T., Role of decreased plasma volume in hematocrit alterations during incremental treadmill exercise in horses. *Am J Physiol*, **1993**. 265(2 Pt 2): p. R404-8. DOI: 10.1152/ajpregu.1993.265.2.R404.
43. Flethøj, M., Schwarzwald, C.C., Haugaard, M.M., Carstensen, H., Kanters, J.K., Olsen, L.H., and Buhl, R., Left Ventricular Function After Prolonged Exercise in Equine Endurance Athletes. *J. Vet. Intern. Med.*, **2016**. 30(4): p. 1260-9. DOI: 10.1111/jvim.13982.
44. Robert, C., Goachet, A.G., Fraipont, A., Votion, D.M., Van Erck, E., and Leclerc, J.L., Hydration and electrolyte balance in horses during an endurance season. *Equine Vet. J. Suppl.*, **2010**(38): p. 98-104. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2010.00198.x.
45. Muñoz, A., Riber, C., Trigo, P., Castejón-Riber, C., and Castejón, F.M., Dehydration, electrolyte imbalances and renin-angiotensin-aldosterone-vasopressin axis in successful and unsuccessful endurance horses. *Equine Vet. J. Suppl.*, **2010**(38): p. 83-90. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2010.00211.x.
46. Riccioni, G., Scotti, L., Guagnano, M.T., Bosco, G., Bucciarelli, V., Di Ilio, E., Speranza, L., Martini, F., and Bucciarelli, T., Physical exercise reduces synthesis of ADMA, SDMA, and L-Arg. *Front Biosci (Elite Ed)*, **2015**. 7: p. 417-22. DOI: 10.2741/e739.
47. Nyborg, C., Bonnevie-Svendson, M., Melsom, H.S., Melau, J., Seljeftot, I., and Hisdal, J., Reduced L-Arginine and L-Arginine-ADMA-Ratio, and Increased SDMA after Norseman Xtreme Triathlon. *Sports*, **2021**. 9(9): p. 120. DOI: 10.3390/sports9090120.
48. Arfuso, F., Rizzo, M., Giannetto, C., Giudice, E., Cirincione, R., Cassata, G., Cicero, L., and Piccione, G., Oxidant and Antioxidant Parameters Assessment Together with Homocysteine and Muscle Enzymes in Racehorses: Evaluation of Positive Effects of Exercise. *Antioxidants*, **2022**. 11(6): p. 1176.
49. Kowalik, S. and Tomaszewska, E., Does routine exercise induce stress and in consequence serum amyloid A (SAA) response in purebred Arabian racehorses? *Pferdeheilkunde*, **2018**. 34(2): p. 121-125. DOI: 10.21836/PEM20180203.
50. Brooks, G.A., Cell-cell and intracellular lactate shuttles. *J. Physiol.*, **2009**. 587(23): p. 5591-5600.
51. Volfinger, L., Lassourd, V., Michaux, J., Braun, J., and Toutain, P., Kinetic evaluation of muscle damage during exercise by calculation of amount of creatine kinase released. *Am J Physiol*, **1994**. 266(2): p. R434-R441.
52. Glitz, F., *Muskelenzymmuster und Elimination von iv applizierten, homologen Muskelenzymen beim Pferd*. 1997, Tierärztliche Hochschule Hannover.
53. Allaam M., E.Y., Nayel M., Elsify A., Salama A., Hassan H., Hassan M. and Kamar A., Physiological and hemato-chemical evaluation of thoroughbred race horse after exercise. *IJAVMS*, **2014**. 8: p. 81-93.
54. Ebrahim, Z.K., Metwally, A.M., and Elshahawy, I.I., Some clinical, hematological and biochemical alterations in endurance horses after 40 km endurance race. *Alex J Vet Sci*, **2019**. 61(1): p. 133-139. DOI: 10.5455/ajvs.30637.
55. Hassan, H.Y., Aly, M.A., Elseady, Y.M., Nayel, M.A., Elsify, A.M., Salama, A.A., Hassan, M.S., Elbarody, E.F., and Kamar, A.B., The effect of race in the clinical, hematological and biochemical biomarkers in Thoroughbred horses. *Alex J Vet Sci*, **2015**. 46: p. 161-169. DOI: <http://www.scopemed.org/fulltextpdf.php?mno=190592>.
56. Miglio, A., Cappelli, K., Capomaccio, S., Mecocci, S., Silvestrelli, M., and Antognoni, M.T., Metabolic and biomolecular changes induced by incremental long-term training in young thoroughbred racehorses during first workout season. *Animals*, **2020**. 10(2). DOI: 10.3390/ani10020317.
57. McKeever, K., Hinchcliff, K., Schmall, L., and Muir 3rd, W., Renal tubular function in horses during submaximal exercise. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **1991**. 261(3): p. R553-R560.

58. Hinchcliff, K., McKeever, K., Schmall, L., Kohn, C., and Muir 3rd, W., Renal and systemic hemodynamic responses to sustained submaximal exertion in horses. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **1990**. 258(5): p. R1177-R1183.
59. Rose, R.J., Arnold, K.S., Church, S., and Paris, R., Plasma and sweat electrolyte concentrations in the horse during long distance exercise. *Equine Vet. J.*, **1980**. 12(1): p. 19-22. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1980.tb02290.x>.
60. Weiss, D., Weishaupt, M.A., Forrer, R., Fakler, A., Spichiger, U.E., Burger, D., Wanner, M., and Riond, J.L., Effects of sweat loss induced by treadmill exercise on magnesium and calcium homeostasis in Franches-Montagnes horses. *Pferdeheilkunde*, **2002**. 18(1): p. 5-10.
61. Hoyt, J.K., Potter, G.D., Greene, L.W., and Anderson, J.G., Mineral balance in resting and exercised miniature horses. *J. Equine Vet. Sci.*, **1995**. 15(7): p. 310-314. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(06\)81736-3](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(06)81736-3).
62. Degens, H. and Jones, D.A., Are Force Enhancement after Stretch and Muscle Fatigue Due to Effects of Elevated Inorganic Phosphate and Low Calcium on Cross Bridge Kinetics? *Medicina (Kaunas)*, **2020**. 56(5). DOI: 10.3390/medicina56050249.
63. Zobba, R., Ardu, M., Niccolini, S., Cubeddu, F., Dimauro, C., Bonelli, P., Dedola, C., Visco, S., and Pinna Parpaglia, M.L., Physical, Hematological, and Biochemical Responses to Acute Intense Exercise in Polo Horses. *J. Equine Vet. Sci.*, **2011**. 31(9): p. 542-548. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2011.03.010>.
64. Lhotta, K., Störungen des Phosphathaushaltes. *J. Klin. Endokrinol. Stoffwechsl.*, **2011**. 4 ((4)): p. 20-23.
65. Hureau, T.J., Broxterman, R.M., Weavil, J.C., Lewis, M.T., Layec, G., and Amann, M., On the role of skeletal muscle acidosis and inorganic phosphates as determinants of central and peripheral fatigue: A (31) P-MRS study. *J. Physiol.*, **2022**. 600(13): p. 3069-3081. DOI: 10.1113/jp283036.
66. Von Engelhardt, W. and Breves, G., *Physiologie der Haustiere*. Schweiz. Arch. Tierheilkd. Vol. 147. 2005. 507-507.
67. Hickman, P.E., Potter, J.M., Aroney, C., Koerbin, G., Southcott, E., Wu, A.H., and Roberts, M.S., Cardiac troponin may be released by ischemia alone, without necrosis. *Clin. Chim. Acta*, **2010**. 411(5): p. 318-323. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2009.12.009>.
68. Sabatine, M.S., Morrow, D.A., De Lemos, J.A., Jarolim, P., and Braunwald, E., Detection of acute changes in circulating troponin in the setting of transient stress test-induced myocardial ischaemia using an ultrasensitive assay: results from TIMI 35. *Eur. Heart J.*, **2008**. 30(2): p. 162-169. DOI: 10.1093/eurheartj/ehn504.
69. Wijnberg, I.D. and Franklin, S.H., The heart remains the core: cardiac causes of poor performance in horses compared to human athletes. *Comp. Exerc. Physiol.*, **2017**. 13(3): p. 149-174. DOI: 10.3920/CEP170012.
70. Trachsel, D.S., Schwarzwald, C.C., Bitschnau, C., Grenacher, B., and Weishaupt, M.A., Atrial natriuretic peptide and cardiac troponin I concentrations in healthy Warmblood horses and in Warmblood horses with mitral regurgitation at rest and after exercise. *J. Vet. Cardiol.*, **2013**. 15(2): p. 105-121. DOI: 10.1016/j.jvc.2012.12.003.
71. Eijsvogels, T.M., Hoogerwerf, M.D., Oudegeest-Sander, M.H., Hopman, M.T., and Thijssen, D.H., The impact of exercise intensity on cardiac troponin I release. *Int. J. Cardiol.*, **2014**. 171(1): p. e3-4. DOI: 10.1016/j.ijcard.2013.11.050.
72. Legaz-Arrese, A., López-Laval, I., George, K., Puente-Lanzarote, J.J., Mayolas-Pi, C., Serrano-Ostáriz, E., Revilla-Martí, P., Moliner-Urdiales, D., and Reverter-Masià, J., Impact of an endurance training program on exercise-induced cardiac biomarker release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2015**. 308(8): p. H913-20. DOI: 10.1152/ajpheart.00914.2014.
73. Gresslien, T. and Agewall, S., Troponin and exercise. *Int. J. Cardiol.*, **2016**. 221: p. 609-621. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.06.243.
74. Degens, H. and Veerkamp, J.H., Changes in oxidative capacity and fatigue resistance in skeletal muscle. *Int. J. Biochem.*, **1994**. 26(7): p. 871-878. DOI: [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(94\)90079-5](https://doi.org/10.1016/0020-711X(94)90079-5).
75. Arfuso, F., Giannetto, C., Giudice, E., Fazio, F., Panzera, M., and Piccione, G., Peripheral Modulators of the Central Fatigue Development and Their Relationship with Athletic Performance in Jumper Horses. *Animals (Basel)*, **2021**. 11(3). DOI: 10.3390/ani11030743.
76. Ament, W. and Verkerke, G.J., Exercise and fatigue. *Sports Med.*, **2009**. 39(5): p. 389-422. DOI: 10.2165/00007256-200939050-00005.
77. Edwards, R.H., Human muscle function and fatigue. *Ciba Found Symp*, **1981**. 82: p. 1-18. DOI: 10.1002/9780470715420.ch1.
78. Scott, J.M. and Warburton, D.E., Mechanisms underpinning exercise-induced changes in left ventricular function. *Med. Sci. Sports Exerc.*, **2008**. 40(8): p. 1400-7. DOI: 10.1249/MSS.0b013e318172cf10.

79. Brancaccio, P., Limongelli, F.M., and Maffulli, N., Monitoring of serum enzymes in sport. *Br. J. Sports Med.*, **2006**. 40(2): p. 96-7. DOI: 10.1136/bjism.2005.020719.
80. Friedrichs, K.R., Harr, K.E., Freeman, K.P., Szladovits, B., Walton, R.M., Barnhart, K.F., and Blanco-Chavez, J., ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Vet. Clin. Pathol.*, **2012**. 41(4): p. 441-453.

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



### 3.2. Publikation II

**Titel:** Blood-based assessment of oxidative stress, inflammation, endocrine and metabolic adaptations in eventing horses accounting for plasma volume shift after exercise

**AutorInnen:** Giers, J.; Bartel, A.; Kirsch, K.; Müller, S.F.; Horstmann, S.; Gehlen, H.

**Zeitschrift:** Journal of Veterinary Medicine and Science

**Verlag:** Wiley

**DOI:** <https://doi.org/10.1002/vms3.1409>

**License:** CC BY 4.0

**Veröffentlicht am:** 22.03.2024





**Zitation:** Giers, J.; Bartel, A.; Kirsch, K.; Müller, S.F.; Horstmann, S.; Gehlen, H. (2024): Blood-based assessment of oxidative stress, inflammation, endocrine and metabolic adaptations in eventing horses accounting for plasma volume shift after exercise, *Veterinary Medicine and Science*, 10, e1409. <https://doi.org/10.1002/vms3.1409>

Name	Bezeichnung AutorIn	Erläuterung Anteil Leistung
<b>Johanna Giers</b>	Erstautorin	Formale Analyse, Durchführung der Untersuchungen, Datenkuratierung, Erstellung des Manuskripts, Erstellen von Abbildungen
<b>Alexander Bartel</b>	Co-Autor	Software, Validierung, Formale Analyse, Datenkuratierung, Korrekturlesen des Manuskripts, Erstellen von Abbildungen
<b>Katharina Kirsch</b>	Co-Autorin	Konzeptualisierung, Methodik, Validierung, Beschaffung von Ressourcen, Korrekturlesen des Manuskripts, Fördermittelakquise
<b>Simon Franz Müller</b>	Co-Autor	Validierung, Beschaffung von Ressourcen, Korrekturlesen des Manuskripts
<b>Stephanie Horstmann</b>	Co-Autorin	Konzeptualisierung, Methodik, Korrekturlesen des Manuskripts
<b>Heidrun Gehlen</b>	Co-Autorin	Konzeptualisierung, Methodik, Validierung, Beschaffung von Ressourcen, Korrekturlesen des Manuskripts, Supervision, Projektadministration, Fördermittelakquise

## ORIGINAL ARTICLE

## EQUINE

# Blood-based assessment of oxidative stress, inflammation, endocrine and metabolic adaptations in eventing horses accounting for plasma volume shift after exercise

Johanna Giers<sup>1</sup>  | Alexander Bartel<sup>2</sup>  | Katharina Kirsch<sup>3</sup>  |  
Simon Franz Müller<sup>4</sup>  | Stephanie Horstmann<sup>5</sup> | Heidrun Gehlen<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Equine Clinic, Internal Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

<sup>2</sup>Institute for Veterinary Epidemiology and Biostatistics, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

<sup>3</sup>Department Sensors and Modeling, Leibniz Institute for Agricultural Engineering and Bioeconomy (ATB), Potsdam, Germany

<sup>4</sup>Laboklin Veterinary Laboratory Diagnostics, Bad Kissingen, Germany

<sup>5</sup>German Olympic Committee for Equestrian Sports (DOKR), Warendorf, Germany

## Correspondence

Johanna Giers, Equine Clinic, Internal Medicine, Freie Universität Berlin, Oertzenweg 19b, Berlin 14193, Germany. Email: [johanna.giers@fu-berlin.de](mailto:johanna.giers@fu-berlin.de)

## Funding information

Bundesinstitut für Sportwissenschaften (BISp), Grant/Award Number: ZMVI4-070101\_16-17

## Abstract

**Background:** After submaximal exercise, blood values of eventing horses show physiological reactions.

**Objectives:** This prospective longitudinal study investigated blood parameters in 20 elite eventing horses before and after two–four-star cross-country rides.

**Methods:** Using a mixed model adjusting for plasma volume shift, we assessed exercisedependent parameters and compared blood values with reference ranges for healthy horses at rest.

**Results:** Following exercise, cortisol, triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4) showed short-term increases, and superoxide-dismutase showed a small short-term increase. Hepatic values showed short-term (haemoglobin [HGB], globulins) or sustained increases (bilirubin, glutamate dehydrogenase, alanine aminotransferase).

Digestionrelated parameters showed small short-term increases ( $\alpha$ -amylase, triglycerides) or decreases (cholesterol, DGGR-lipase), apparent through plasma shift adjustment. Zinc decreased in the short term, and iron showed a delayed decrease. White blood cell count increased persistently after training, whereas serum amyloid A remained unchanged.

**Conclusions:** Exercised eventing horses had consistently elevated HGB and cortisol levels 10 and 30 min after submaximal exercise, exceeding the reference ranges for healthy horses at rest. Exercise activates the hypothalamic–pituitary–adrenocortical and hypothalamic–pituitary–thyroid axes. Antioxidant activity was observed.

Increased energy requirements led to the mobilization of energy reserves, and a sustained increase in liver enzymes indicated hepatocellular injury. Mild haemolysis suggested increased muscle metabolism, whereas signs of inflammation were subtle. Further research is needed to identify which horses deviate from mean values.

## KEYWORDS

cross-country, eventing, oxidative stress, performance diagnostics, serum amyloid, sport horses, superoxide-dismutase

## 1 | INTRODUCTION

Fatal injuries in eventing competitions have raised the question of whether the sport is fundamentally dangerous to the health of competing horses. A recent assessment of the physiological responses of blood-based markers to cross-country exercise provides objective information on the health, stress levels and performance of competing horses.

Ensuring energy supply during exercise involves endocrine responses. Cortisol modulates physical and mental performance demands on the hypothalamic–pituitary–adrenocortical (HPA) axis (Fazio et al., 2015; Ferlazzo et al., 2018, 2020; González et al., 1998; Kowalik & Tomaszewska, 2018; Liburt et al., 2013). Ferlazzo et al. (2018) resumed that in different equine disciplines, the role of the hypothalamic–pituitary–thyroid (HPT) axis and a connection to the HPA axis in response to physical exercise are suspected but not yet understood. Iodothyronines, especially T3, significantly impact exercise metabolism, accelerating the conversion of carbohydrates, proteins and fats at the cellular level (Ferlazzo et al., 2018, 2020). Although T4 can only be formed in the thyroid gland, T3 can also be synthesized extrathyroidally in target tissues such as muscles (Fazio et al., 2015). T3 increases after standardized exercise tests in standardbred racehorses (Fazio et al., 2022) and maximal speed tests in thoroughbred racehorses (González et al., 1998). A T4 increase 30 min after exercise has only been observed in isolated cases after different exercise intensities, whereas T4 levels 24 h after exercise are often altered (Ferlazzo et al., 2020).

Oxidative stress, which arises from an imbalance between the production and neutralization of reactive oxygen species (ROS) (Siqueira et al., 2014; Williams, 2016), can lead to muscle damage, fatigue and decreased performance (Siqueira et al., 2014; Williams et al., 2004). To reduce the harmful effects of ROS, antioxidant defence systems play a crucial role, consisting of enzymatic components like superoxidodismutase (SOD) and non-enzymatic components like tocopherols (Siqueira et al., 2014). Williams and Burk (2012) found that markers of antioxidant status were upregulated in eventing horses after difficult exercise, which they attribute to increased scavenging of ROS.

Metabolic stress is caused by the increased energy requirements of physical exercise. Cross-country exercise places aerobic and, as difficulty increases, increasingly anaerobic metabolic demands on the equine body (Amory et al., 1993; Muñoz et al., 1999; Williams & Burk, 2012). Anaerobic energy can be supplied through anaerobic glycolysis from glucose and through the creatine–phosphate–ATP pathway (McGowan et al., 2002). Conversely, aerobic energy supply relies on aerobic glycolysis from carbohydrates or beta-oxidation from fats (McGowan et al., 2002). Metabolic stress can also lead to an accumulation of metabolic products, which

may contribute to fatigue and muscle exhaustion (Hureau et al., 2022; McGowan et al., 2002; Mihelic et al., 2022).

Inflammation is another possible stress factor for horses in eventing competitions (Arfuso et al., 2020; Munsters et al., 2014). Although inflammatory responses are a natural part of adaptive mechanisms (Kellmann et al., 2018), overtraining can lead to excessive inflammatory responses that negatively impact the athlete (Witkowska-Pilaszewicz, Baska, 2019; Witkowska-Pilaszewicz, Żmigrodzka, 2019). Serum amyloid A (SAA), a highly sensitive but non-specific marker of inflammation, has been extensively studied in horses for detection of different subclinical pathologies, as well as for monitoring the response of treatment (Kowalik & Tomaszewska, 2018; Long & Nolen-Walston, 2020; Turlo et al., 2016; Valle et al., 2015; Witkowska-Pilaszewicz, et al., 2019). Valle et al. (2015) did not observe an increase in SAA but did observe an increase in leukocyte levels after a national Italian eventing competition in eight warmblood horses, although SAA appears to be more sensitive to inflammation than white blood cell (WBC) counts (Long & Nolen-Walston, 2020).

The present study provides benchmarks for trained and healthy horses and various blood parameters after submaximal exercise in modern high-level eventing competitions. Our approach accounts for plasma volume shifts during exercise, enhancing the interpretation of blood values. A better understanding of different physiological pathways and comparison with valid reference ranges for healthy horses at rest will contribute to improved monitoring of the performance, well-being and health of eventing horses.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

Riders and owners were informed in writing about the study conditions and gave their written consent for voluntary and free participation. The study was not classified as an animal experiment but was registered with the regulatory state office of Berlin (1-02.04.40.2022.VG006). Blood samples were collected by veterinarians involved in routine performance diagnostics as part of the 'performance monitoring programme' of the German Olympic Committee for Equestrian Sports (DOKR).

TABLE 1 Characteristics of horses participating in the study.

Horse ID	Age (years)	Breed	Sex	International experience <sup>†</sup>	Competitions during season 2022 <sup>‡</sup>
1	7	Holsteiner	Mare	2	4
2	7	Oldenburger	Mare	5	6
3	7	Hanoverian	Mare	3	6
4	8	Oldenburger	Mare	11	7
5	8	Westphalian	Gelding	4	4
6	9	Hanoverian	Gelding	11	6
7	9	German Sport Horse	Mare	11	4
8	10	Polish Horse Breeders Association	Mare	17	7
9	10	Irish Sport Horse	Gelding	18	4
10	11	Hanoverian	Gelding	15	5
11	11	Holsteiner	Gelding	20	6
12	12	Stud Book du Cheval Selle Français	Mare	22	6
13	12	Hanoverian	Gelding	31	6
14	12	Irish Sport Horse	Gelding	28	6
15	12	Hanoverian	Mare	17	7
16	14	Hanoverian	Gelding	22	6
17	14	Holsteiner	Gelding	35	3
18	15	Hanoverian	Mare	56	5
19	15	Rheinlander	Mare	24	2
20	15	Hanoverian	Gelding	40	8

<sup>†</sup>Number of starts in international eventing competitions before start of season 2022.

<sup>‡</sup>Number of international eventing competitions during season 2022.

All horses were clinically and echocardiographically examined by DOKR project veterinarians and declared healthy before participation. None of the horses were treated with treatment techniques or medication that contravened the Fédération Equestre Internationale (FEI) (2022a, 2022b, 2022c, 2022d) rules for international eventing competitions. The riders also confirmed that the horses did not receive any intravenous infusions during the competitions. Only authorized oral electrolyte substitution was administered in individual cases.

## 2.1 | Study design

Materials and methods in this study are consistent with those used in Giers et al. (2023), as the parameters were measured in the same blood samples. The study took place between March and September 2022 at 14 international two- to four-star level eventing competitions at five different venues in Germany and Poland. Nine riders with 20 horses participated in the study. All horses were sampled at 2–5 competitions throughout the season, resulting in 4–20 samples per horse. Before and after each test, the horses were subjected to mandatory veterinary checks by official FEI veterinarians and were declared 'fit to compete'.

TABLE 2 Cross-country competition information, as well as distance, speed, environmental parameters, ground and altitude profile.

Competition	Level	Week	Venue	Horses N=	Distance [m]	Speed required [m/min]	Temperature [°C]	Ground	Altitude profile	Weather
1	CCI3*-S	12	A	11	3401	550	13	Normal	Flat	Cloudy
2	CCI3*-S	15	B	7	3007	520	16	Normal	Intermediate	Sunny
3	CCI2*-S	16	A	2	3000	520	16	Normal	Flat	Cloudy
4	CIC2*-L	18	C	1	3787	520	16	Deep	Hilly	Sunny
5	CCI2*-S	18	C	2	3085	520	18	Normal	Hilly	Cloudy
6	CCI4*-S	18	C	7	3705	570	20	Deep	Hilly	Sunny
7	CCI4*-S	24	A	3	3772	570	29	Normal	Flat	Sunny
8	CIC3*-L	25	A	3	4455	550	26	Normal	Flat	Sunny
9	CCI3*-S	25	A	3	3364	550	25	Normal	Flat	Sunny
10	CCI2*-S	30	D	2	2661	520	20	Normal	Hilly	Cloudy
11	CCI3*-S	30	D	6	3538	550	20	Normal	Hilly	Cloudy
12	CCI2*-S	35	E	1	3087	520	28	Normal	Flat	Sunny
13	CCI3*-S	35	E	2	3470	550	28	Normal	Flat	Sunny
14	CCI4*-S	35	E	5	3580	570	28	Normal	Flat	Sunny

Abbreviations: '-L', long format; '-S', short format; CCI, Concours Complet International; CIC, Concours International Combiné.

### 2.1.1 | Horses

The subjects of the present longitudinal observational study were horse-rider combinations that were monitored as part of the 'performance monitoring programme' project of the DOKR. Horses in the study were aged between 7 and 15 years, with an average age of 11. The population consisted of 10 mares and 10 geldings. The horses belonged to nine different warmblood breeds (Table 1). Relevant horse identification information was obtained from the FEI database [2022b](#).

### 2.1.2 | Riders

The riders were aged between 21 and 39. The average age was 28. There were three male and five female riders in the study. In order to compete at their respective test level, all of the riders achieved the appropriate performance level through placings in lower classes to ensure they had a comparable level of performance.

### 2.1.3 | Training schedules

The horses had been individually prepared for the competition by their riders and trainers. Each training schedule includes dressage, jumping and cross-country training, as well as basic endurance training, light work days and paddock or pasture-only days. The specific training schedule for each horse was neither reported nor standardized. Neither feeding nor water intake were recorded or standardized during the season, which had an effect on the interpretability of the digestion-associated parameters.

### 2.1.4 | Exercise

An eventing competition consists of three subtests: dressage, jumping and cross-country. This study focuses on the cross-country test, which was either the second or third test in the eventing competition, depending on the test format.

Nine rides at a 2-star level, 31 rides at a 3-star level and 15 rides at a 4-star level were sampled in accordance with the rules of the FEI for international eventing competitions ([2022a](#)). The specific test requirements for the cross-country tests are set out in Table 2. An average of 9.2 penalty points was achieved in the cross-country test. Horse falls led to the disqualification in two rides, and in one ride, a rider chose to retire. Information on

diet, water intake, and additional exercise during the competition days was not recorded.

### 2.1.5 | Sampling times

The collection of samples was carried out at different time points, including the morning before exercise (Pre), 10 min (10 min) and 30 min (30 min) after the completion of the exercise and 24 h after the Pre sample (next morning). The pre-exercise and next morning samples were collected between 4:00 and 7:30 AM, whereas the 10 and 30 min samples were collected between 9:00 AM and 5:00 PM, depending on the different starting times of the horses. Consequently, the time intervals between the pre- and post-exercise samples, as well as between the 30 min samples and the next morning samples, varied according to the horses' start times. The time between 30 min after exercise and the next morning ranged from 11 to 21 h, whereas the time between the pre-sample and the next morning was consistently 24 h ( $\pm 1$  h).

## 2.2 | Sample collection

In the morning before and in the morning after the cross-country test, the blood samples were taken in the horses' stables so that all blood samples could be taken within 30 min. For the samples taken 10 and 30 min after the finish, the time at which the respective horse crossed the finish line was observed, and the respective test time was determined. The blood samples were then obtained either in the finish area or in the stable area, depending on where the horses were found. Blood samples were drawn from the horses' jugular veins, and the puncture site was disinfected with 1-propanol. Venous blood was collected using a Vacutainer system equipped with 20G needles and polyethylene terephthalate tubes. During each blood collection, first a serum tube and then an EDTA tube were filled. After each blood collection, EDTA whole blood tubes were stored in a refrigerator at +5°C within 5 min, whereas serum gel tubes were left at room temperature for 30–60 min until clotting occurred. A portable centrifuge, model EBA 200 from Andreas Hettich GmbH & Co. KG, was used to centrifuge the serum tubes at  $1000 \times g$  for 10 min before transferring the serum to uncoated plastic tubes, which were immediately frozen at -20°C. The blood samples were processed in a mobile laboratory in the finish area of the cross-country course or in the stable area.

**TABLE 3** Blood-based biomarker and associated categories.

Category	Biomarker
Hormones	T3, T4, cortisol
Antioxidative markers	SOD, vitamin E
Hepatic values	HGB, bilirubin, GGT, GLDH, globulines, ALT
Digestion	$\alpha$ -Amylase, AP, cholesterol, triglycerides, DGGR-lipase
Trace elements	Iron, copper, selenium, zinc
Inflammatory markers	WBC, SAA

Abbreviations: AP, alkaline phosphatase; GGT,  $\gamma$ -glutamyl transferase; GLDH, glutamate dehydrogenase; HGB, haemoglobin; SAA, serum amyloid A; SOD, superoxide-dismutase; WBC, white blood cell.

### 2.2.1 | Sample storage and transport to testing laboratory

The blood samples were taken, stored and processed as described in Giers et al. (2023). The samples were transported in electric freezers that maintained a constant temperature of +5 and -20°C, respectively. All samples were transported from the venue to the in-house laboratory of the German Equestrian Federation in Warendorf within 48 h, where the refrigerated EDTA whole blood samples were measured immediately. The serum samples were stored at 20°C for a maximum of 8 weeks until they were sent frozen to the external testing laboratory, LABOKLIN GmbH & Co.KG.

### 2.2.2 | Blood parameters

In addition to parameters discussed in our previous work (Giers et al., 2023), this work focuses on parameters measured in the areas of inflammation, oxidative stress, hormones, liver, digestion and trace elements (Table 3). Leucocytes (WBC), superoxide dismutase (SOD), cortisol and haemoglobin (HGB) were determined at all time points, whereas parameters  $\alpha$ -amylase, alkaline phosphatase (AP),  $\gamma$ -glutamyl transferase (GGT), glutamate dehydrogenase (GLDH), DGGR-lipase, bilirubin, cholesterol (CHOL), triglycerides (TRIG), globulines (GLOB), SAA, iron, copper, zinc, selenium, vitamin E (Vit. E), T3 and T4 were not determined 10 min post-exercise but at all other measurement time points.

### 2.2.3 | Measurement techniques

WBC and HGB were determined using laser flow cytometry and laminar flow impedance in a ProCyte DX haematology analyser from IDEXX Laboratories Inc. Serum samples were further processed in the investigation laboratory (LABOKLIN). T3 and T4 were measured with a chemiluminescence assay (LIA), T3 by ADVIA Centaur XPT 2000 (Siemens), and T4 by Immulite 2000 (Siemens). Vit. E analysis was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) in an HPLC LC-20 (Shimadzu). An atomic absorption spectrometry (AAS) Zenit 650 P (Analytik Jena GmbH), which measures with AAS, was used for the selenium analyses. The concentration of SOD was determined using a manual enzymatic reaction with materials from the manufacturer, Cayman Chemical. All other blood chemical parameters were measured photometrically or potentiometrically in a cobas 8000 (Roche).

## 2.3 | Missing values

In 54 of 55 rides, sample sets were complete. The 'next morning' sample is missing in one set because the rider refused to take the sample in a stressful situation. In two blood collections, the serum tube was lost after collection. In one blood collection, the amount of blood was insufficient to fill all sample tubes, resulting in the absence of certain values for this measurement.

## 2.4 | Data analysis

Statistical analyses were performed using Jamovi (Version 2.3) ('The jamovi project (2022) jamovi (Version 2.3) [Computer Software]'). Boxplot, histogram and Q-Q plot were used to visually check the normality of the data. Due to non-normality, GGT, GLDH, SOD, T3, TRIG and  $\alpha$ -amylase values were log-transformed. SAA values were log<sub>1p</sub>-transformed.

### 2.4.1 | Plasma volume shift adjustment

Blood values are expressed as concentrations, which represent an amount per volume. During exercise, intravascular blood volume changes due to splenic contraction, plasma volume loss and dehydration. Furthermore, the actual amount of blood parameters (e.g. cells, enzymes and metabolites) changes. Separating the volumerelated changes from the quantity-related changes can contribute to a more accurate understanding of the effects of exercise on specific parameters and specific body systems.

To separate volume effects from quantity effects, we used the adjustment proposed in Giers et al. (2023) for the plasma volume shift during exercise. The albumin concentration is used

as a marker for the concentration effect that occurs due to the plasma volume shift from intra- to extravascular (Assunção et al., 2019; EclinPath, 2023; Giers et al., 2023).

The observed values 10 and 30 min after the end of exercise were adjusted by a calculated factor, whereas the values pre-exercise and the next morning remained unadjusted. The following formula was used for the adjustment:

$$\text{adjusted value} = \text{measured value}_{\text{time point } x} / (1 + \text{plasma volume loss (\%)}_{\text{time point } x}) \quad (1)$$

### 2.4.2 | Mixed model

Estimated marginal means (EMMs) were calculated using a mixed model. Time point was used as a fixed effect, and 'horse' nested in 'rider' as well as 'competition' nested in 'event' were used as random effects to account for clustering. The normality of the residual distribution was assessed through a normal likelihood plot of the residuals.

The mixed model was employed for both the observed and adjusted datasets. Figures display EMMs (with confidence intervals) for the adjusted values, represented by light grey dots with dark grey bars. In this study, 95% confidence intervals were computed, and the significance threshold was established at 5%. The *p*-values presented in the figures indicate the difference in EMM between the 'Pre' time point and the corresponding time point, and these values were computed using the plasma shift-adjusted data.

For SAA, no adjusted EMMs are shown in Figure 6b, as they do not differ from the EMM without adjustment.

We investigated whether the parameters of interest showed exercise-related increases or decreases, quantified the magnitude of these changes and assessed how much their EMMs deviated from the reference ranges for healthy horses at rest. We calculated the relative changes in the unadjusted EMMs ( $\text{EMM}_{\text{unadjusted}}$ ) at the different time points.

Blood values outside the established reference ranges are usually highlighted in laboratory reports to facilitate prompt identification by veterinarians. Therefore, we counted the instances where values fell outside the reference ranges to assess the frequency of such deviations and their potential clinical significance.

## 3 | RESULTS

The observed descriptive data (Table S1) as well as the EMMs of the unadjusted values (Table S2) and their 95% confidence intervals for the respective parameters are presented in the supplements.

### 3.1 | Hormones

For the thyroid hormones T3 and T4, ranges between 28.1 and 185.1 ng/dL and 0.7–3.8 µg/dL were measured, with, respectively, 0.6% of the T3 values outside the reference range and 13.0% below the reference range for T4. A maximum cortisol level of 121 ng/mL was measured. Overall, 57.5% of the cortisol values are above the reference range. Cortisol values were above the reference range in 54 of 55 rides. T3 was above the reference range in only one ride, whereas T4 was below the reference range in 11 rides. The hormone concentrations of T3 ( $p = 0.006$ ), T4 ( $p < 0.001$ ) and cortisol ( $p < 0.001$ ) change significantly through exercise. T4 values pre-exercise and the next morning are within the lower range of the reference (Figure 1b). For cortisol, the EMMs are above the reference range for time points 10 and 30 min post-exercises. T3 is 44% higher 30 min post-exercise than pre-exercise (Figure 1a). T4 is 25% higher 30 min post-exercise compared to pre-exercise (Figure 1b). The next morning, only a 2% increase in T3 remained. Cortisol is still 60% elevated 30 min postexercise (Figure 1c). In contrast, the next morning, the cortisol level was 12% lower than pre-exercise.

### 3.2 | Antioxidative markers

SOD and Vit. E were measured as markers for oxidative stress. SOD ranged from 0.254 to 14.646 U/mL. For Vit. E, the values were between 1.3 and 7.2 U/L. For SOD, the laboratory (LABOKLIN GmbH) does not provide a validated reference range in horses. Exercise has no significant influence on the values of SOD ( $p = 0.137$ ), but on the values of Vit. E ( $p = 0.041$ ). All EMMs are within the reference range for Vit. E. SOD shows significant increases in value before exercise compared to 10 and 30 min post-exercise. SOD is estimated to be 38% higher 30 min after exercise and 20% higher the next morning compared to Pre, although the deviation is no longer significant the next morning (Figure 2a). Vit. E concentration shows a 6% increase 30 min after the end of exercise and an 8% increase in the morning after exercise (Figure 2b).

### 3.3 | Hepatic values

HGB ranged between 84 and 264 g/L, GGT between 3.7 and 69.9 U/L and GLDH between 0.2 and 31.5 U/L. For ALT, bilirubin, and GLOB, all values are within the respective reference range. Overall, 29.2% of the HGB, 12.3% of the GGT and 4.3% of the GLDH values were above the respective reference range. HGB was above the reference in 48 out of 55 rides and below the reference in 2 rides. GGT and GLDH were elevated in 8 and 6 out of 55 rides, respectively. The liver-

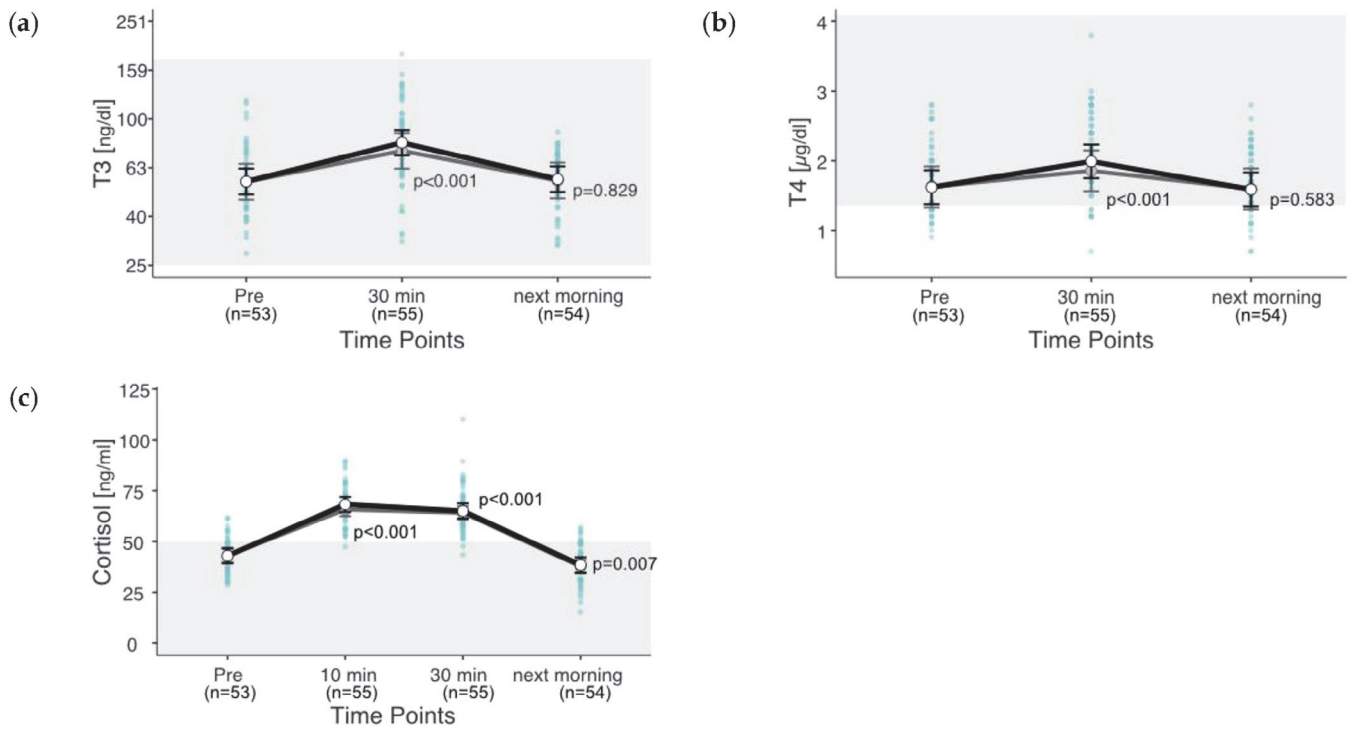
related parameters HGB, bilirubin, GLDH, globulins and ALT responded to exercise ( $p < 0.05$ ), but GGT did not ( $p = 0.482$ ). Only HGB 10 min after the end of the exercise is above the reference range. The 25% HGB increase 30 min post-exercise is fully recovered the next morning (2% increase) (Figure 3a). In the case of bilirubin, 13% of the 15% increase after 30 min still remains the next morning (Figure 3b). Of the 12% increase in GGT concentration 30 min post-exercise, 9% increase is still present the next morning (Figure 3c). In the case of GLDH, 30 min postexercise, a 77% increase was observed, which remained until the next morning (Figure 3d). ALT showed an increase between 22% (30 min) and 16% (next morning) (Figure 3f).

### 3.4 | Digestion-associated parameters

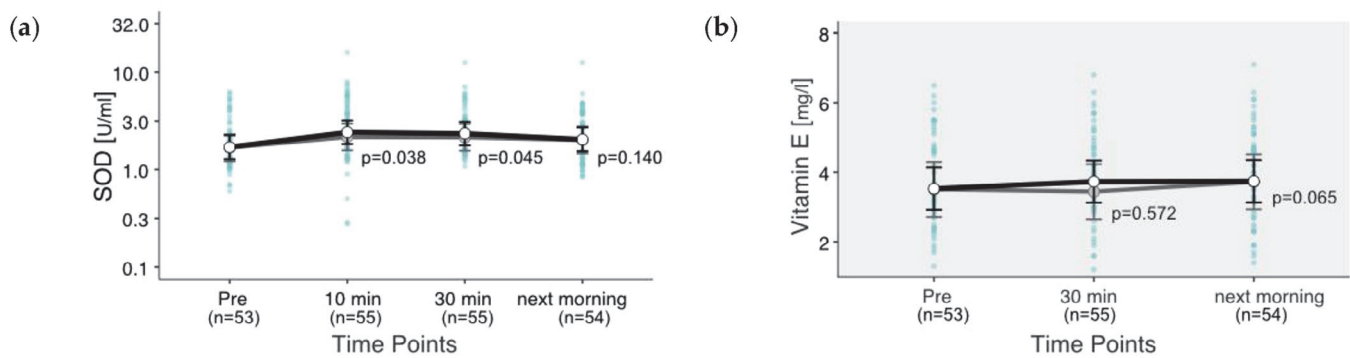
For the digestion-associated parameters,  $\alpha$ -amylase, AP and CHOL showed only values within the reference ranges. Overall, 2.5% of the TRIG values were above the reference range, with a maximum of 1.97 mmol/L. For DGGR-Lipase, 11.7% of the values were above the reference range, with a maximum of 30.5 U/L. Although TRIG were elevated in only four rides, lipase was above the reference range in 14 of 55 rides. Exercise changed the values of all digestion-associated parameters ( $p < 0.05$ ), except AP ( $p = 0.456$ ). The EMMs of the digestion-associated parameters were all within the respective reference ranges (Figure 4a,e). The strongest percentage changes 30 min post-exercise showed TRIG with a 26% increase (Figure 4d).  $\alpha$ -Amylase increased by 25% at 30 min post-exercise (Figure 4a).

The next morning, AP showed the largest increase (7%) among the digestion-associated parameters.

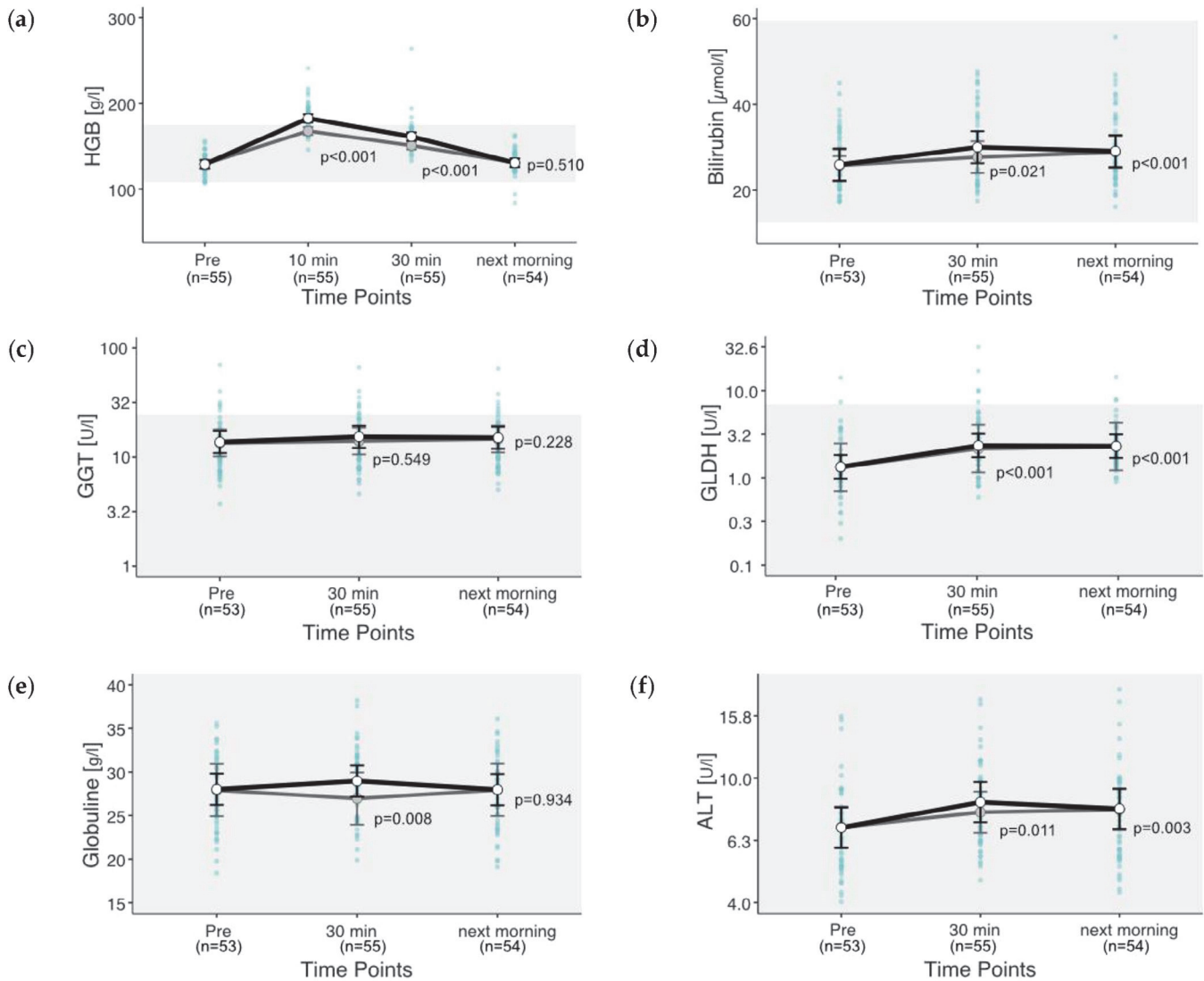




**FIGURE 1(a-c) Changes in hormones after exercise.** Estimated marginal means (EMMs) (white dots) and their 95% confidence intervals (black whiskers) of blood parameters at measured time points. Grey dots and whiskers represent EMM and 95% confidence intervals when 10 and 30 min post-exercise values were adjusted for plasma shift. *p*-Values apply to the difference between Pre and the respective time point. Blue dots represent observed values. The grey box symbolizes the current reference range for healthy horses at rest of the related blood parameters. Mixed model of blood values against time points. Two random effects ('horse' in 'rider'; 'competition' in 'event') to adjust for the hierarchical structure of the data.



**FIGURE 2(a and b) Changes in antioxidative markers after exercise.** Estimated marginal means (EMMs) (white dots) and their 95% confidence intervals (black whiskers) of blood parameters at measured time points. Grey dots and whiskers represent EMM and 95% confidence intervals when 10 and 30 min post-exercise values were adjusted for plasma shift. *p*-Values apply to the difference between Pre and the respective time point. Blue dots represent observed values. The grey box symbolizes the current reference range for healthy horses at rest of the related blood parameters. Mixed model of blood values against time points. Two random effects ('horse' in 'rider'; 'competition' in 'event') to adjust for the hierarchical structure of the data.



**FIGURE 3(a-f) Changes in hepatic values after exercise.** Estimated marginal means (EMMs) (white dots) and their 95% confidence intervals (black whiskers) of blood parameters at measured time points. Grey dots and whiskers represent EMM and 95% confidence intervals when 10 and 30 min post-exercise values were adjusted for plasma shift. *p*-Values apply to the difference between Pre and the respective time point. Blue dots represent observed values. The grey box symbolizes the current reference range for healthy horses at rest of the related blood parameters. Mixed model of blood values against time points. Two random effects ('horse' in 'rider'; 'competition' in 'event') to adjust for the hierarchical structure of the data.

### 3.5 | Trace elements

Overall, 16.0% of the iron values were below the reference with a minimum of 7  $\mu\text{mol/L}$ . Overall, 3.7% of the copper values were above the reference range, with a maximum of 25.9  $\mu\text{mol/L}$ . Overall, 10.5% of the zinc values were below the reference, at a minimum of 4.7  $\mu\text{mol/L}$ . For selenium, 3.7% of the values were below and 4.3% above the reference range, with a range of 76.3–227  $\mu\text{g/L}$ . Zinc was below the reference in 14 out of 55 rides, and iron in 19 of 55 rides. Exercise significantly changed the concentrations of iron ( $p < 0.001$ ) and zinc ( $p = 0.013$ ). Exercise did not significantly change the concentrations of copper ( $p = 0.353$ ) and selenium ( $p = 0.865$ ). All estimated trace element values are within the respective reference ranges (Figure 5a,d).

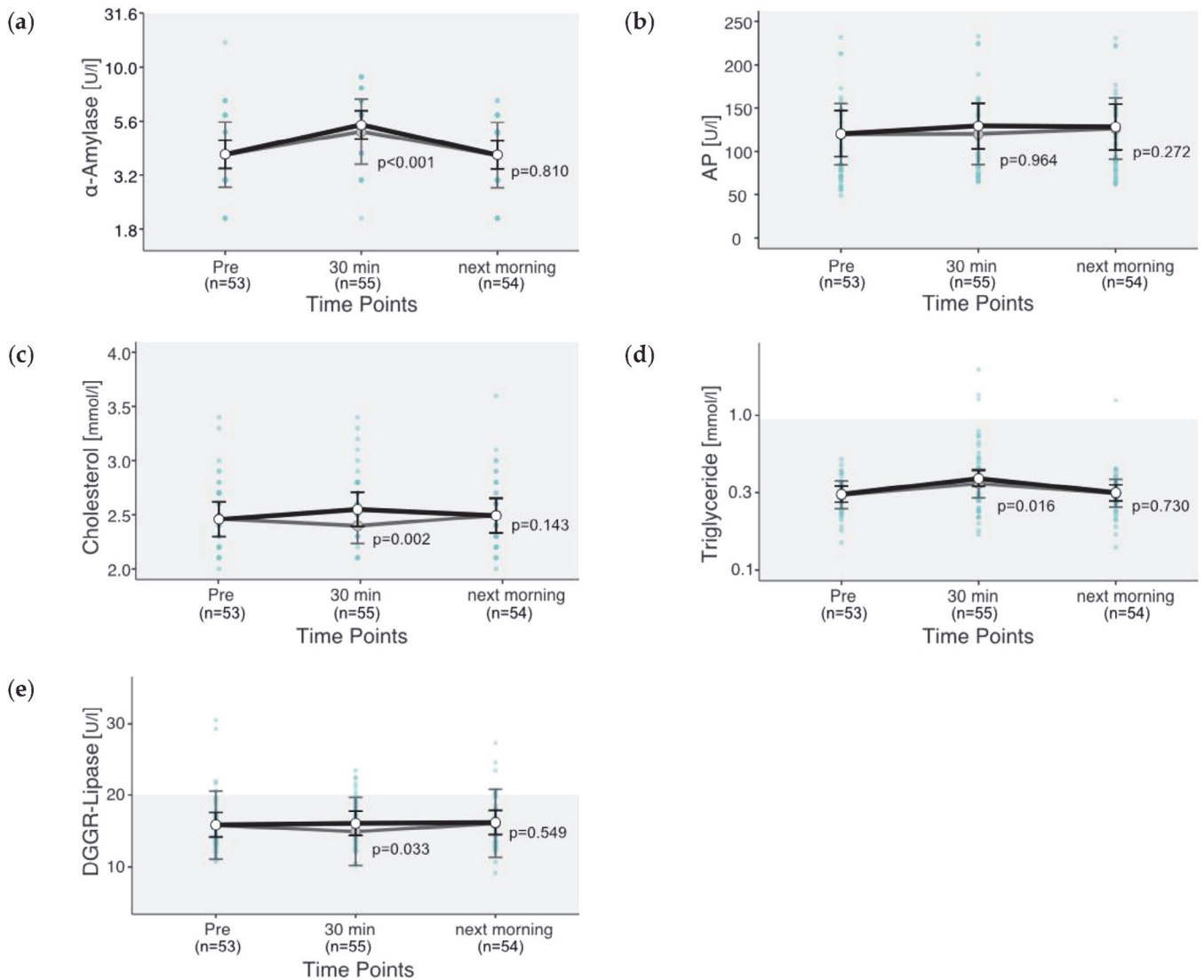
The largest percentage changes 30 min post-exercise showed iron (14% increase) and selenium (7% increase). The next morning, iron showed the strongest changes, with an 11% decrease compared to pre-exercise.

### 3.6 | Inflammatory markers

Leukocytes (WBC) and SAA were measured as inflammatory markers. WBC ranged from 5.18 to 17.8  $\times 10^9/\text{L}$ . SAA values lay between 0.1 and 758.6  $\mu\text{g/mL}$ . Overall, 5.5% of the WBC values and 20.4% of the SAA values exceeded the reference range.

Although WBC was elevated in 6 out of 55 rides, SAA had values above the reference in 21 rides, of which 11 were measured at rest. WBC responded to the exercise ( $p < 0.001$ ), whereas SAA did not ( $p = 0.586$ ). WBCs are well within the

Of the 55 rides sampled, these 2 falls were the only horse falls. Both horses were declared 'fit to compete' before the ride. (Overall, 100% of the fallen horses had an elevated SAA value of over 200  $\mu\text{g/mL}$  before the ride.)

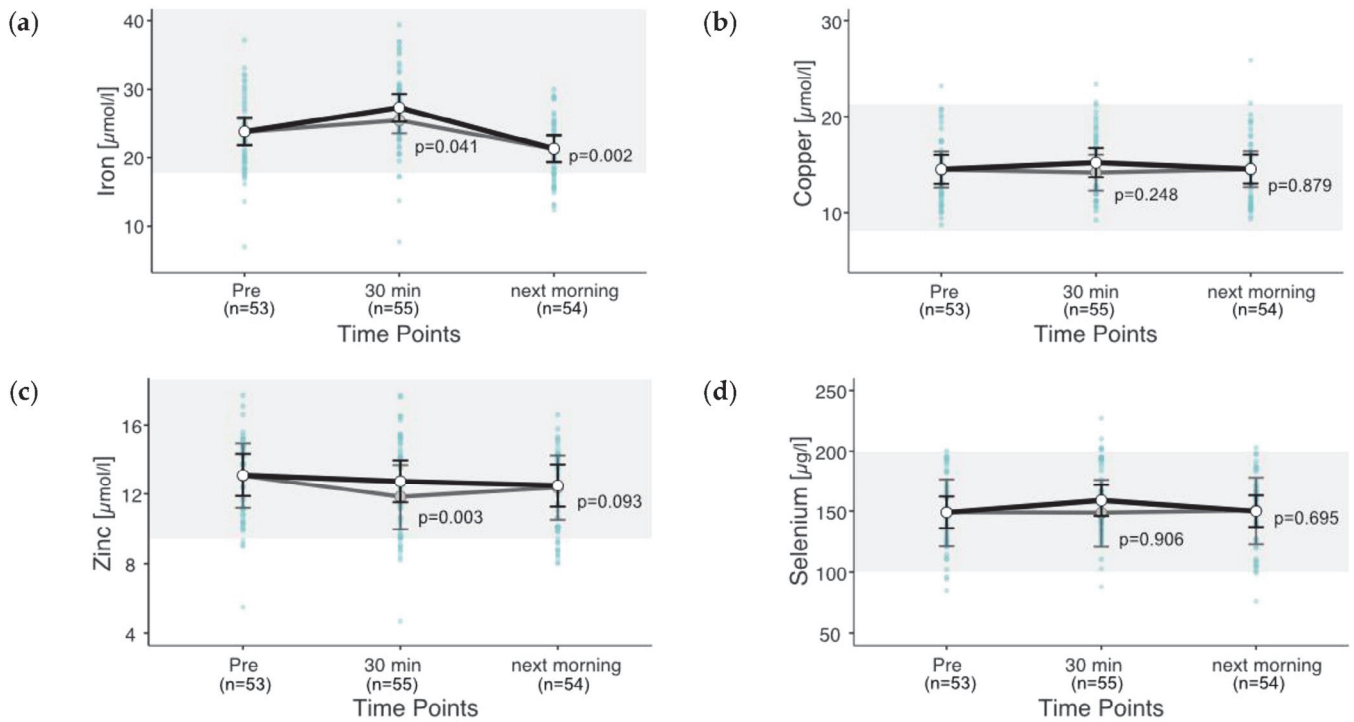


**FIGURE 4(a-e) Changes in digestion-associated parameters after exercise.** Estimated marginal means (EMMs) (white dots) and their 95% confidence intervals (black whiskers) of blood parameters at measured time points. Grey dots and whiskers represent EMM and 95% confidence intervals when 10 and 30 min post-exercise values were adjusted for plasma shift.  $p$ -Values apply to the difference between Pre and the respective time point. Blue dots represent observed values. The grey box symbolizes the current reference range for healthy horses at rest of the related blood parameters. Mixed model of blood values against time points. Two random effects ('horse' in 'rider'; 'competition' in 'event') to adjust for the hierarchical structure of the data.

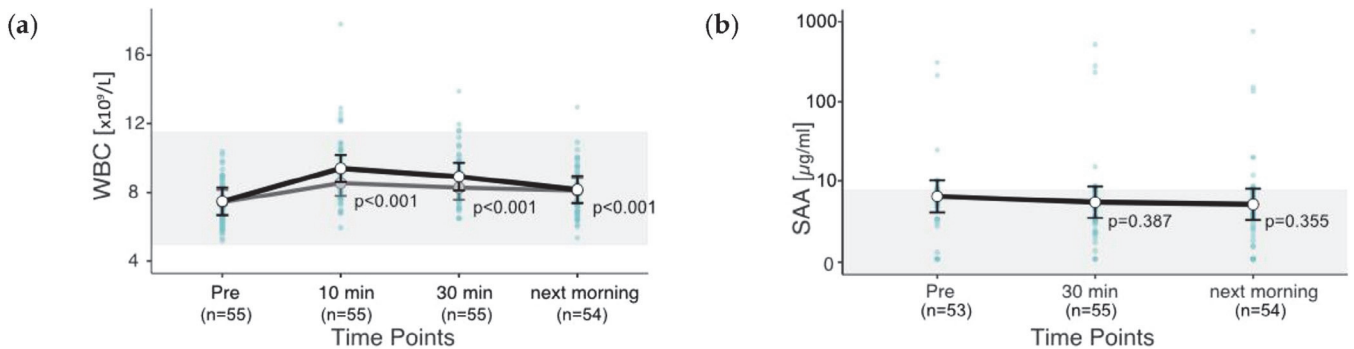
reference range at all time points (Figure 6a). For SAA, the whiskers are close to or above the upper limit of the reference range at all measurement times (Figure 6b). WBCs react quickly; 30 min after the end of exercise, a 19% increase is present, of which a 9% increase remains the next morning. In 55 rides, a pre-ride SAA value of over 200  $\mu\text{g/mL}$  was measured in only two cases. All other pre-ride SAA values were below 25  $\mu\text{g/mL}$ . The two horses with clearly elevated pre-ride SAA values both suffered falls during the cross-country course.

## 4 | DISCUSSION

When a vet looks at a horse's blood values after exercise, the question is whether blood values outside the reference range are pathological or not. In this study, we present data from a large number of exercising horses to show which blood values are regularly outside the reference ranges for healthy horses at rest. In addition, this study shows how inflammation, oxidative stress, metabolic stress, and endocrine responses manifest in



**FIGURE 5 (a–d) Changes in trace elements after exercise.** Estimated marginal means (EMMs) (white dots) and their 95% confidence intervals (black whiskers) of blood parameters at measured time points. Grey dots and whiskers represent EMM and 95% confidence intervals when 10 and 30 min post-exercise values were adjusted for plasma shift. *p*-Values apply to the difference between Pre and the respective time point. Blue dots represent observed values. The grey box symbolizes the current reference range for healthy horses at rest of the related blood parameters. Mixed model of blood values against time points. Two random effects ('horse' in 'rider'; 'competition' in 'event') to adjust for the hierarchical structure of the data.



**FIGURE 6 (a and b) Changes in inflammatory markers after exercise.** Estimated marginal means (EMMs) (white dots) and their 95% confidence intervals (black whiskers) of blood parameters at measured time points. Grey dots and whiskers represent EMM and 95% confidence intervals when 10 and 30 min post-exercise values were adjusted for plasma shift. *p*-Values apply to the difference between Pre and the respective time point. Blue dots represent observed values. The grey box symbolizes the current reference range for healthy horses at rest of the related blood parameters. Mixed model of blood values against time points. Two random effects ('horse' in 'rider'; 'competition' in 'event') to adjust for the hierarchical structure of the data.

most established blood parameters of toplevel eventing horses following modern international cross-country rides.

Mean values for all parameters measured, except HGB and cortisol, remain within the reference ranges for healthy horses at rest at all time points. Cortisol, T3 and T4 show short-term increases after exercise, with only cortisol decreasing the following morning. The antioxidant enzyme SOD shows a small short-term increase. All hepatic values react with short-term (HGB, globulins) or sustained increases (Bilirubin, GLDH, ALT). Parameters related to digestion react with small short-term increases ( $\alpha$ -amylase, TG) or decreases (CHOL, DGGRIpase), which become apparent through the plasma shift adjustment. Zinc showed a short-term decrease, and iron showed a delayed decrease. WBC increased persistently after exercise, whereas SAA did not react.

#### 4.1 | HPA and HPT axes

The short-term increases in cortisol, T3 and T4 are consistent with some of the literature (Fazio et al., 2020; Ferlazzo et al., 2014; Ferlazzo et al., 2020; González et al., 1998; Kowalik & Tomaszewska, 2018; Williams & Burk, 2012). However, there are also studies on jumping horses where T3 and/or T4 did not respond to exercise (Ferlazzo et al., 2014; Fazio et al., 2015), which could be due to lower exercise duration and intensity. The increase in cortisol indicates activation of the HPA axis (Ferlazzo et al., 2020), whereas the increase in T3 does not necessarily imply activation of the HPT axis, as T3 can also be synthesized extrathyroidally (Fazio et al., 2015). However, the increase in T4 argues for direct thyroidal regulation (Fazio et al., 2015; Ferlazzo et al., 2020) and thus for activation of the HPT in eventing horses during intense exercise, which is consistent with the opinion of Ferlazzo et al. (2020). Fazio et al. (2015) speculated that an increase in T4 concentration may be associated with a higher efficiency of the mechanical work performed by the exercising muscle.

Further, the drop in cortisol the next morning was not observed in all studies (Kowalik & Tomaszewska, 2018; Williams & Burk, 2012). But in the study by Liburt et al. (2013), the cortisol concentration after adrenocorticotrophic hormone (ACTH) stimulation also dropped after the short-term sharp increase. ACTH has also been studied in horses following exercise, with the result that ACTH increases depending on the intensity of the exercise (Ferlazzo et al., 2020). Thus, the cortisol curve measured in our study may indicate ACTH stimulation. To our opinion, cross-country exercise results in extensive endocrine adaptations, including activation of the HPA and HPT axes.

#### 4.2 | Oxidative stress and antioxidative defence

The small increase in SOD levels shortly after the end of exercise indicates that ROS production occurs during exercise, leading to the activation of antioxidative defence systems. However, this does not indicate that there is a discrepancy between ROS production and antioxidant systems, which could constitute pathological oxidative stress (Williams & Burk, 2012). But as ROS are difficult to measure due to their short half-lives, metabolic products and cofactors must be used for measurement (Bollinger et al., 2023). Possible reasons for ROS production are increased oxygen consumption and mechanical muscle stress (Williams & Burk, 2012).

De Moffarts et al. (2005) also measured antioxidant markers in eventing horses but, contrary to our results, considered SOD and Vit. E not to be exercise-dependent and therefore only measured preexercise values. Williams and Burk. (2012) measured  $\alpha$ -tocopherol pre and post-exercises and also found a small increase the morning after exercise. In general, the findings of our study are consistent with other studies on eventing horses (Williams, 2016). Our results further support the view of Bollinger et al. (2023) that elevated SOD could be an indicator of antioxidative capacity already being used (e.g. due to insufficient recovery) and not that there is plenty of antioxidant capacity left. We therefore agree with Bollinger et al. (2023) that a low pre-ride SOD is beneficial over a high pre-ride SOD, whereby pre-exercise nutritional supplementation could be influential.

#### 4.3 | Haemolysis

The observed increases in HGB and bilirubin could indicate haemolysis (EclinPath). The HGB increase could also be due to hemoconcentration (EclinPath), but this would have been corrected through plasma volume loss adjustment. Bilirubin, being a by-product of HGB degradation, also serves as an indicator of erythrocyte destruction (EclinPath). The increase in iron concentration 30 min after exercise was also observed by Mihelic et al. (2022) after endurance races and would also speak for haemolysis. However, when considering the plasma shift-adjusted values, it becomes clear that the alleged increase is in fact much smaller and has no relevance. Haemolysis after exercise can be caused by mechanical damage to the erythrocytes or a low oxygen content during exercise and is also suspected in endurance horses (Mihelic et al., 2022). Mechanically induced or cytokine-induced cell damage in the form of an inflammatory reaction in the musculature (Nieman et al., 2005; Smith, 2000) could be the cause of the observed signs of haemolysis. Possibly both – stress on the musculature

and mechanical damage to erythrocytes – may contribute a tiny part to the observed effect.

#### 4.4 | Hepatocellular injury

The increases in the enzymes GGT and GLDH, which persisted until the next morning, could be due to liver cell injury. GLDH increases primarily reflect hepatocellular injury and cholestasis (Satué et al., 2022). GGT, in contrast, is not as liver-specific as GLDH, and the increase in GGT could therefore also arise from muscle cell injury (Satué et al., 2022). If GGT is released from liver cells, this indicates biliary necrosis or hyperplasia (Satué et al., 2022). The enzyme ALT (synonym GPT) is also elevated one night after exercise, which could also be due to liver or muscle cell damage (EclinPath). The increases in GGT and ALT could be interpreted as signs of muscle microdamage, but the GLDH increase remains implicative of prolonged hepatocellular injury. A possible cause of hepatocellular injury may be limited oxygen supply during exercise (Elkady et al., 2021), as hepatic blood flow is significantly lower directly after intense exercise in horses (Dyke et al., 1998). If the blood flow returns to normal after exercise, a hepatocellular injury may occur (Elkady et al., 2021).

A further explanation might be the overall significantly increased metabolism in the liver, which is required for the provision of energy as well as for the processing of waste substances.

The increase of GGT, GLDH and ALT within the reference ranges is considered to be mild, compared with a fivefold increase above the reference range in mild liver disease (Satué et al., 2022). Other studies have also shown that there is an exercise-induced increase in liver enzymes without liver disease (McGowan 2008). In endurance horses, the increase in GGT is not as big, but the increase in AST is even bigger than in eventing horses (Mihelic et al., 2022).

#### 4.5 | Digestion

The enzymes  $\alpha$ -amylase and TG show short-term increases after exercise. The increased TG might be synthesized by the liver and transported to cells with increased energy demand (EclinPath).  $\alpha$ -Amylase is an enzyme that hydrolyses complex carbohydrates into maltose and glucose (EclinPath) and is secreted by the exocrine pancreas into the small intestine. In the digestive tract,  $\alpha$ -amylase thus indirectly ensures that more glucose can be absorbed into the blood. On the one hand, during cross-country exercise,  $\alpha$ -amylase might be excreted to digest available complex carbohydrates and provide energy, which could still be measurable after the end of exercise.

As the digestive function of the intestine is slowed down by the activation of the sympathetic nervous system during exercise, the increased  $\alpha$ -amylase activity could, on the other hand, be a sign of extra-digestive counter-regulation against post-exercise hyperglycaemia. In pigs,  $\alpha$ -amylase has the extra-digestive function of lowering blood glucose levels independently of insulin (Pierzynowski et al., 2017).

If the reference ranges and the range of the measured values are considered, the mean deviations in the digestion-associated parameters are small.

#### 4.6 | Inflammation

There are various studies on SAA in horses pre- and post-exercises (Arfuso et al., 2020; Carvalho Filho et al., 2019; Cywinska et al., 2010; Cywinska et al., 2012; Cywinska et al., 2013; Giori et al., 2011; Kowalik & Tomaszewska, 2018; Kristensen et al., 2014; Long & Nolen-

Walston, 2020; Miglio et al., 2020; Piccione et al., 2016; Rajendren et al., 2019; Siqueira et al., 2016; Turlo et al., 2016; Turlo et al., 2015; Valle et al., 2015; Witkowska-Pilaszewicz et al., 2019; Witkowska-Pilaszewicz et al., 2019). In our study, SAA levels did not change post-exercise. Cywinska et al. (2013) found an SAA response only in young horses after endurance training. Arfuso et al. (2020) found an SAA increase in intensively trained jumpers, and Turlo et al. (2016) found an increase in racehorses after racing. Valle et al. (2015) found a twofold increase in eight eventing horses 10 min after the end of a two-star cross-country phase, but this can be easily explained by the very low pre-ride values and easily put into perspective by the small sample size. For WBC, there are at least three different causes that can lead to the observed slight increase after the end of exercise. First, muscle microdamage could lead to local inflammatory responses (Horohov et al., 2012; Mihelic et al., 2022). Second, increased sympathetic activity due to emotional stress could lead to leukocyte activation (Muñoz et al., 1999; Mihelic et al., 2022). Third, an increase in WBC may also arise from splenic contraction (Carakostas et al., 1981; Muñoz et al., 1999; McGowan, 2008).

As HCT and RBC increases in the same horses also indicate splenic contraction (Giers et al., 2023), at least part of the WBC increase is attributable to this. The theory that the WBC increase results from an activation of WBC from the vascular surface is supported by the increase being measured immediately after the end of exercise. An inflammatory response in the muscles is supported by the increase in muscle enzymes, which provides an indication of muscle microdamage (Giers et al., 2023) and by the distinct iron decrease the next morning, which is also seen as a sign of acute inflammation (Borges et al., 2007). Plasma shift adjustment shows that the WBC concentration in fact does not peak until 10 min after the

end of exercise, so one could assume that not all of the increase is due to splenic contraction and WBC activation. But the fact that SAA, as a significantly more sensitive parameter, also for local inflammatory processes (Long & Nolen-Walston, 2020), does not increase until the next morning speaks against an inflammatory reaction in the entirety of the horses. Based on the observed parameters (SAA, WBC and iron), indications of inflammation are subtle.

The authors believe that pre-ride-SAA could still be interesting to assess the inflammatory status of horses because training adaptations could potentially prevent injuries or falls (Witkowska-Pilaszewicz et al., 2019). This approach has been explored for endurance horses (Cywinska et al., 2010), and above a cut-off value of 1000 µg/mL before exercise, no horse could finish a long distance. We suggest further research on pre-ride SAA levels and injury or fall rates in eventing horses to reduce the risk of injury to horses in eventing competitions.

#### 4.7 | Limitations

The variability in the time span between 30 min post-exercise and the following morning (ranging from 11 to 21 h) is likely to have an impact on the results.

The selection of blood parameters in this study was constrained to well-established ones, which means that a comprehensive examination of organ systems was not undertaken. There are many newer, but currently less established, blood parameters that are also informative for the analysed physiological processes. To assess oxidative stress, we measured an antioxidant enzyme, SOD, but the redox status of the horses was not determined.

One limitation of this study was the small number of horses, which was insufficient for establishing reference values in accordance with the American Society for Veterinary Clinical Pathology guidelines for determining reference intervals in animal species (Friedrichs et al., 2012).

Exercise intensity was not determined using additional, non-bloodbased parameters such as heart rate, which would have improved the interpretation of changes in blood values.

Another significant limitation of the study is that the statistical analysis was limited to mean values, thus not allowing for the identification of individual horses deviating from these mean values. Nevertheless, this study provides a crucial foundation for personalized assessments.

## 5 | CONCLUSION

In summary, increased levels of HGB and cortisol above the reference range occur regularly 10 and 30 min post-exercises in trained eventing horses after difficult international

competitions with submaximal exercise intensity. However, there are also physiological changes within the reference ranges. The HPA axis and the HPT axis are activated, and there is antioxidant activity. The increased energy demand during exercise leads to the mobilization of energy reserves, and a persistent increase in liver enzymes indicates hepatocellular injury. Signs of haemolysis reflect increased muscle metabolism during exercise. Indications of inflammation are subtle. Further research is needed to identify which horses deviate from mean values.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

*Conceptualization; methodology:* Katharina Kirsch, Stephanie Horstmann and Heidrun Gehlen. *Software:* Alexander Bartel. *Validation:* Alexander Bartel, Katharina Kirsch, Simon Franz Müller and Heidrun Gehlen. *Formal analysis; data curation; visualization:* Alexander Bartel and Johanna Giers. *Investigation; writing – original draft preparation:* Johanna Giers. *Resources:* Katharina Kirsch, Simon Franz Müller and Heidrun Gehlen. *Writing – review and editing:* Katharina Kirsch, Alexander Bartel, Simon Franz Müller, Stephanie Horstmann and Heidrun Gehlen. *Supervision; project administration:* Heidrun Gehlen. *Funding acquisition:* Katharina Kirsch and Heidrun Gehlen. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the DOKR for their support. This research was funded by the Bundesinstitut für Sportwissenschaften (BISp), ZMVI4-070101\_16-17. The publication of this article was funded by Freie Universität Berlin.

#### CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

S.F.M. is employed at the contributing commercial veterinary diagnostics laboratory, LABOKLIN GmbH & Co. KG as head of research and development of the department of clinical pathology, but has no role in the design of the study, in the collection of samples, in the interpretation of data or in the decision to publish the results. The authors declare no conflicts of interest.

#### INSTITUTIONAL REVIEW BOARD STATEMENT

The study was registered with the regulatory state office of Berlin (1-02.04.40.2022.VG006) but was not classified as an animal experiment.

#### INFORMED CONSENT STATEMENT

Riders and owners received written information about the study conditions and agreed in writing to the voluntary and unremunerated participation of their horses.

### ANIMAL WELFARE STATEMENT

The study was registered with the regulatory state office of Berlin (102.04.40.2022.VG006) but was not classified as an animal experiment. The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal's author guidelines page, have been adhered to.

### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data is not publicly available due to privacy.

### ORCID

Johanna Giers  <https://orcid.org/0009-0007-0845-5316>

Alexander Bartel  <https://orcid.org/0000-0002-1280-6138>

Katharina Kirsch  <https://orcid.org/0000-0002-5223-0647>

Simon Franz Müller  <https://orcid.org/0000-0002-5429-0088>

Heidrun Gehlen  <https://orcid.org/0000-0001-5451-4232>

### PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1002/vms3.1409>.

### ETHICS STATEMENT

The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal's author guidelines page, have been adhered to and the appropriate ethical review committee approval has been received.

### REFERENCES

- Amory, H., Art, T., Linden, A., Desmecht, D., Buchet, M., & Lekeux, P. (1993). Physiological response to the cross-country phase in eventing horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 13(11), 646–650. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(07\)80396-0](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(07)80396-0)
- Arfuso, F., Giannetto, C., Fazio, F., Panzera, F., & Piccione, G. (2020). Training program intensity induces an acute phase response in clinically healthy horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 88, 102986. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.102986>
- Assunção, P., Barbosa, T., Yonezawa, L., Barbosa, L., Watanabe, M., Kohayagawa, A., & Schmidt, E. (2019). Acute-phase protein profile in horses subjected to different exercise protocols. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 83(4), 272–278. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6753884/pdf/cjvr\\_04\\_272.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6753884/pdf/cjvr_04_272.pdf)
- Bollinger, L., Bartel, A., Weber, C., & Gehlen, H. (2023). Pre-ride biomarkers and endurance horse welfare: Analyzing the impact of the elimination of superoxide-dismutase,  $\delta$ -Aminolevulinic-dehydratase, Thiobarbituric acid reactive substances, iron, and serum amyloid A levels in elite 160 km endurance rides. *Animals*, 13(10), 1670. <https://doi.org/10.3390/ani13101670>
- Borges, A. S., Divers, T. J., Stokol, T., & Mohammed, O. H. (2007). Serum iron and plasma fibrinogen concentrations as indicators of systemic inflammatory diseases in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(3), 489–494. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2007\)21\[489:siapfc\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2007)21[489:siapfc]2.0.co;2)
- Carakostas, M. C., Moore, W. E., & Smith, J. E. (1981). Intravascular neutrophilic granulocyte kinetics in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 42(4), 623–625.
- Carvalho Filho, W. P., Fonseca, L. A., Girardi, F. M., Bento, L. D., Souto, P. C., & Orozco, A. M. O. (2019). Serum amyloid a and muscle activity biomarkers in horses submitted to equestrian show jumping. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 39(8), 668–671. <https://doi.org/10.1590/16785150-PVB-6218>
- Cywinska, A., Gorecka, R., Szarska, E., Witkowski, L., Dziekan, P., & Schollenberger, A. (2010). Serum amyloid A level as a potential indicator of the status of endurance horses. *Equine Veterinary Journal*, 42(Suppl 38), 23–27. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00280.x>
- Cywinska, A., Szarska, E., Górecka, R., Witkowski, L., Hecold, M., Bereznowski, A., Schollenberger, A., & Winnicka, A. (2012). Acute phase protein concentrations after limited distance and long distance endurance rides in horses. *Research in Veterinary Science*, 93(3), 1402–1406. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.02.008>
- Cywinska, A., Witkowski, L., Szarska, E., Schollenberger, A., & Winnicka, A. (2013). Serum amyloid A (SAA) concentration after training sessions in Arabian race and endurance horses. *BMC Veterinary Research*, 9, 91. <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/9/91/abstract>
- De Moffarts, B., Kirschvink, N., van Erck, E., Art, T., Pincemail, J., & Lekeux, P. (2005). Assessment of the oxidant/antioxidant blood balance in a field exercise test in Standardbred and eventing horses. *Comp Exerc Physiol*, 2(4), 253–261. <https://doi.org/10.1079/ECP200567>
- Dyke, T. M., Hubbell, J. A., Sams, R. A., & Hinchcliff, K. W. (1998). Hepatic blood flow in horses during the recuperative period from maximal exercise. *American Journal of Veterinary Research*, 59(11), 1476–1480.
- eClinPath.com. Cornell University. Accessed 27 May 2023. <https://eclinpath.com/>
- Elkady, A. H., Elkafoury, B. M., Saad, D. A., Abd el-Wahed, D. M., Baher, W., & Ahmed, M. A. (2021). Hepatic ischemia reperfusion injury: Effect of moderate intensity exercise and oxytocin compared to L-arginine in a rat model. *Egyptian Liver Journal*, 11(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s43066021-00111-w>
- Fazio, E., Cravana, C., Ferlazzo, A. M., Ferlazzo, A., & Medica, P. (2020). Effect of increasing exercise levels, feeding-housing regimes and sex on the total and free iodothyronines of trained horses. *APMB*, 108(2). <https://doi.org/10.6092/1828-6550/APMB.108.2.2020.OS1>
- Fazio, E., Lindner, A., Cravana, C., Wegener, J., Medica, P., Hart-Mann, U., & Ferlazzo, A. (2022). Effects of standardized exercise tests on plasma thyroid hormones' kinetics in standardbred racehorses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 110, 103853. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103853>
- Fazio, E., Medica, P., Cravana, C., Pellizzotto, R., Fragalà, S., & Ferlazzo, A. (2015). Dynamics of total and free iodothyronines of jumping horses on the responses to competition and transport. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(1), 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2014.11.006>
- Fédération Equestre Internationale. (2022a) *Eventing rules*. Fédération Equestre Internationale. <https://inside.fei.org/fei/disc/eventing/rules>
- Fédération Equestre Internationale. (2022b) *FEI database*. FEI. <https://data.fei.org/Horse/Search.aspx>
- Fédération Equestre Internationale. (2022c). *Equine anti-doping and controlled medication regulations*. FEI.
- Fédération Equestre Internationale. (2022d). *Veterinary regulations*. FEI.
- Ferlazzo, A., Cravana, C., Fazio, E., & Medica, P. (2018). Is there an interplay between the hypothalamus–pituitary–thyroid and the hypothalamus–pituitary–adrenal axes during exercise-stress coping in horses? *Journal of Equine Veterinary Science*, 62, 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.08.018>
- Ferlazzo, A., Cravana, C., Fazio, E., & Medica, P. (2020). The different hormonal system during exercise stress coping in horses. *Veterinary World*, 13(5), 847–859. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.847-859>
- Ferlazzo, A., Fazio, E., Cravana, C., & Medica, P. (2014). Changes of circulating total and free iodothyronines in horses after competitive show jumping with different fence height. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(1), 876881. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2014.03.001>
- Friedrichs, K. R., Harr, K. E., Freeman, K. P., Szladovits, B., Walton, R. M., Barnhart, K. F., & Blanco-Chavez, J. (2012). ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(4), 441–453.
- Giers, J., Bartel, A., Kirsch, K., Müller, S. F., Horstmann, S., & Gehlen, H. (2023). Blood-based markers for skeletal and cardiac muscle



- function in eventing horses before and after cross-country rides and how they are influenced by plasma volume shift. *Animals*, 13(19), 3110. <https://www.mdpi.com/2076-2615/13/19/3110>
- Giori, L., Moretti, P., Giordano, A., & Paltrinieri, S. (2011). Short-term evaluation of serum amyloid A after exercise in clinically healthy horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 31(9), 499–501. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2011.05.008>
- González, O., González, E., Sánchez, C., Pinto, J., González, I., Enriquez, O., Martínez, R., Figueira, G., & White, A. (1998). Effect of exercise on erythrocyte  $\beta$ -adrenergic receptors and plasma concentrations of catecholamines and thyroid hormones in thoroughbred horses. *Equine Veterinary Journal*, 30(1), 72–78. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1998.tb04091.x>
- Horohov, D. W., Sinatra, S. T., Chopra, R. K., Jankowitz, S., Betancourt, A., & Bloomer, R. J. (2012). The effect of exercise and nutritional supplementation on proinflammatory cytokine expression in young racehorses during training. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(12), 805–815. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.03.017>
- Hureau, T. J., Broxterman, R. M., Weavil, J. C., Lewis, M. T., Layec, G., & Amann, M. (2022). On the role of skeletal muscle acidosis and inorganic phosphates as determinants of central and peripheral fatigue: A (31) PMRS study. *The Journal of Physiology*, 600(13), 3069–3081. <https://doi.org/10.1113/jp283036>
- Kellmann, M., Bertollo, M., Bosquet, L., Brink, M., Coutts, A. J., Duffield, R., Erlacher, D., Halson, S. L., Hecksteden, A., Heidari, J., Kallus, K. W., Meeusen, R., Mujika, I., Robazza, C., Skorski, S., Venter, R., & Beckmann, J. (2018). Recovery and performance in sport: Consensus statement. *International Journal of Sports Physiology and Performance*, 13(2), 240–245. <https://doi.org/10.1123/ijspp.2017-0759>
- Kowalik, S., & Tomaszewska, E. (2018). Does routine exercise induce stress and in consequence serum amyloid A (SAA) response in purebred Arabian racehorses? *Pferdeheilkunde*, 34(2), 121–125. <https://doi.org/10.21836/PEM20180203>
- Kristensen, L., Buhl, R., Nostel, K., Bak, L., Petersen, E., Lindholm, M., & Jacobsen, S. (2014). Acute exercise does not induce an acute phase response (APR) in Standardbred trotters. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78(2), 97–102. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3962284/pdf/cjvr\\_04\\_97.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3962284/pdf/cjvr_04_97.pdf)
- Liburt, N. R., McKeever, K. H., Malinowski, K., Smarsh, D. N., & Geor, R. J. (2013). Response of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to stimulation tests before and after exercise training in old and young Standardbred mares. *Journal of Animal Science*, 91(11), 5208–5219. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6329>
- Long, A., & Nolen-Walston, R. (2020). Equine inflammatory markers in the twenty-first century: A focus on Serum amyloid A. *The Veterinary Clinician of North America: Equine Practice*, 36(1), 147–160. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2019.12.005>
- McGowan, C. (2008). Clinical pathology in the racing horse: The role of clinical pathology in assessing fitness and performance in the racehorse. *The Veterinary Clinician of North America: Equine Practice*, 24(2), 405–421 vii. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2008.03.001>
- McGowan, C. M., Golland, L. C., Evans, D. L., Hodgson, D. R., & Rose, R. J. (2002). Effects of prolonged training, overtraining and detraining on skeletal muscle metabolites and enzymes. *Equine Veterinary Journal*, 34(S34), 257–263. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2002.tb05429.x>
- Miglio, A., Cappelli, K., Capomaccio, S., Mecocci, S., Silvestrelli, M., & Antognoni, M. T. (2020). Metabolic and biomolecular changes induced by incremental long-term training in young thoroughbred racehorses during first workout season. *Animals*, 10(2), 317. <https://doi.org/10.3390/ani10020317>
- Mihelic, K., Vrbanac, Z., Bojanić, K., Kostanjšak, T., Ljubić, B. B., Gotić, J., Vnuk, D., & Bottegaro, N. B. (2022). Changes in acute phase response biomarkers in racing endurance horses. *Animals (Basel)*, 12(21), 2993. <https://doi.org/10.3390/ani12212993>
- Muñoz, A., Riber, C., Santisteban, R., Rubio, M. D., Agüera, E. I., & Castejón, F. M. (1999). Cardiovascular and metabolic adaptations in horses competing in cross-country events. *Journal of Veterinary Medical Science*, 61(1), 13–20. <https://doi.org/10.1292/jvms.61.13>
- Munsters, C. B. M., Van Iwaarden, A., Van Weeren, R., & Sloet Van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. M. (2014). Exercise testing in warmblood sport horses under field conditions. *The Veterinary Journal*, 202(1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.07.019>
- Nieman, D. C., Dumke, C. L., Henson, D. A., McAnulty, S. R., Gross, S. J., & Lind, R. H. (2005). Muscle damage is linked to cytokine changes following a 160-km race. *Brain, Behavior, and Immunity*, 19(5), 398–403. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2005.03.008>
- Piccione, G., Bazzano, M., Bruschetta, D., Giannetto, C., Arfuso, F., & Giudice, E. (2016). Omega-3 fatty acid food enrichment influences some serum acute phase proteins concentration and white blood cell count in athlete horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 39, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.11.007>
- Pierzynowski, S. G., Goncharova, K., Gregory, P. C., Weström, B., Podpryato v, S. E., Podpriatov, S. S., Woliński, J., Repich, H., Wierup, N., & Lozinska, L. (2017). Experiments suggesting extra-digestive effects of enteral pancreatic amylase and its peptides on glucose homeostasis in a pig model. *Scientific Reports*, 7(1), 8628. <https://doi.org/10.1038/s41598017-07387-2>
- Rajendren, S. K., Khairuddin, N. H., & Sugnaseelan, S. (2019). Concentration of serum amyloid A in clinically normal endurance horses in Malaysia. *Jurnal Veterinar Malaysia*, 31(1), 28–33. [http://jvm.vam.org.my/wp-content/uploads/2019/07/JVM-2019-Issue-1\\_Hayar.pdf](http://jvm.vam.org.my/wp-content/uploads/2019/07/JVM-2019-Issue-1_Hayar.pdf)
- Satué, K., Miguel-Pastor, L., Chicharro, D., & Gardón, J. C. (2022). Hepatic enzyme profile in horses. *Animals*, 12(7), 861. <https://doi.org/10.3390/ani12070861>
- Siqueira, R. F., Weigel, R. A., Nunes, G. R., Mori, C. S., & Fernandes, W. R. (2014). Oxidative profiles of endurance horses racing different distances. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 66(2), 455–461. <https://doi.org/10.1590/1678-41625760>
- Siqueira, R. F. D., & Fernandes, W. R. (2016). Post-race inflammatory markers in endurance horses. *Cienc Rural*, 46(7), 1256–1261. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20151070>
- Smith, L. L. (2000). Cytokine hypothesis of overtraining: A physiological adaptation to excessive stress? *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 32(2), 317–331. <https://doi.org/10.1097/00005768-20000200000011>
- The jamovi project. (2022). jamovi (Version 2.3) [Computer Software]. Accessed 5 December 2022. <https://www.jamovi.org>
- Turlo, A., Cywińska, A., Czopowicz, M., Witkowski, L., Jaśkiewicz, A., & Winnicka, A. (2016). Racing induces changes in the blood concentration of serum amyloid A in thoroughbred racehorses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 36, 15–18. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.09.008>
- Turlo, A., Cywińska, A., Czopowicz, M., Witkowski, L., Szarska, E., & Winnicka, A. (2015). Post-exercise dynamics of serum amyloid A blood concentration in thoroughbred horses classified as injured and noninjured after the race. *Research in Veterinary Science*, 100, 223–225. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.04.008>
- Valle, E., Zanatta, R., Odetti, P., Traverso, N., Furfaro, A., Bergero, D., Badino, P., Girardi, C., Miniscalco, B., Bergagna, S., Tarantola, M., Intorre, L., & Odore, R. (2015). Effects of competition on acute phase proteins and lymphocyte subpopulations—Oxidative stress markers in eventing horses. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99(5), 856–863. <https://doi.org/10.1111/jpn.12289>
- Williams, C. A. (2016). Horse species symposium: The effect of oxidative stress during exercise in the horse<sup>1</sup>. *Journal of Animal Science*, 94(10), 4067–4075. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9988>
- Williams, C. A., & Burk, A. O. (2012). Antioxidant status in elite threeday event horses during competition. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 572090. <https://doi.org/10.1155/2012/572090>
- Williams, C. A., Kronfeld, D. S., Hess, T. M., Saker, K. E., Waldron, J. N., Crandell, K. M., Hoffman, R. M., & Harris, P. A. (2004). Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race. *Journal of Animal Science*, 82(2), 588–594. <https://doi.org/10.2527/2004.822588x>
- Witkowska-Pilasiewicz, O., Baška, P., Czopowicz, M., Żmigrodzka, M., Szczepaniak, J., Szarska, E., Winnicka, A., & Cywińska, A. (2019). Changes in serum amyloid A (SAA) concentration in Arabian endurance horses during first training season. *Animals*, 9(6), 330. <https://doi.org/10.3390/ani9060330>
- Witkowska-Pilasiewicz, O., Żmigrodzka, M., Winnicka, A., Miśkiewicz, A., Strzelec, K., & Cywińska, A. (2019). Serum amyloid A in equine health and disease. *Equine Veterinary Journal*, 51(3), 293–298. <https://doi.org/10.1111/evj.13062>



---

## IV. Diskussion

In der humanen Sportmedizin hat sich gezeigt, dass die Gestaltung der Erholungsphase ein großes Potenzial zur Optimierung der Leistungsfähigkeit bietet. Nach dem Vorbild der menschlichen Leistungsdiagnostik ist der erste Schritt zur Beurteilung der Erholung die Messung der Ermüdung. Dazu müssen zunächst belastungsabhängige Parameter identifiziert werden. Zudem ist es von Bedeutung, die zugrunde liegenden physiologischen Prozesse, die mit den jeweiligen belastungsabhängigen Parametern verbunden sind, zu verstehen.

Diese Dissertation untersucht Blutparameter von 20 hochklassigen Geländepferden vor und nach Geländeritten. Der erste Artikel konzentriert sich auf Analyse von Blutparametern, um spezifische muskuläre und kardiale Reaktionen während der Belastung zu identifizieren. Der zweite Artikel erweitert diesen Ansatz und untersucht zusätzlich entzündliche, endokrine und metabolische Anpassungen. Beide Artikel zeigen komplexe physiologische Anpassungen bei Geländepferden an submaximale Belastung. In beiden Artikeln wurden belastungsabhängige blutbasierte Biomarker identifiziert, die sich damit für die Zusammenstellung eines Panels von blutbasierten Biomarkern für die Leistungsdiagnostik eignen. In beiden Artikeln wurden die Messwerte mit den Referenzbereichen für gesunde Pferde in Ruhe verglichen. Die Ergebnisse sind für die Leistungsdiagnostik und das Training von Vielseitigkeitspferden von großer Relevanz und damit auch ein wichtiger Beitrag zur Gesunderhaltung der Pferde.

### 4.1. Plasmavolumenadjustierung

Da die Plasmakonzentrationen der Parameter durch die Effekte Milzkontraktion, Plasmavolumenverschiebung und Dehydratation beeinflusst werden können (McKeever et al. 1993, Robert et al. 2010, Assunção et al. 2019), wurde eine Adjustierung vorgenommen. Die Adjustierung der Blutwerte für die unter Belastung eintretende Plasmavolumenverschiebung wird in beiden Artikeln mithilfe derselben Formel auf Basis der Albumin-Konzentration vorgenommen. Die Konzentrationen der im ersten Artikel untersuchten Parameter wurden durch die Plasmavolumenverschiebung stärker verändert als die der im zweiten Artikel untersuchten Parameter. Dennoch stellt die Anpassung für die Plasmavolumenverschiebung eine Innovation dar, die die Beurteilung der Belastungsabhängigkeit von Blutparametern verbessert. Die Adjustierung hat erstmals aufgezeigt, dass es bei Vielseitigkeitspferden unter submaximaler Belastung zur Milzkontraktion und zu einer Plasmavolumenverschiebung kommt.

Im Vergleich zu anderen Studien mit maximaler, hochintensiver Belastung (Masri et al. 1990, McKeever et al. 1993, McKeever et al. 1993, Assunção et al. 2019) wurden in dieser Studie

ähnliche Effekte durch die Kontraktion der Milz festgestellt. Vergleichbar mit Studien aus dem Distanzsport (Flethøj et al. 2016, Witkowska-Pilaszewicz et al. 2019) fanden sich auch in dieser Studie Hinweise auf Plasmavolumenverschiebungen während des Geländeritts, jedoch ist der Flüssigkeitsverlust durch Schwitzen und Atmung bei Vielseitigkeitspferden aufgrund der wesentlich kürzeren Belastungsdauer vermutlich geringer.

## **4.2 Kriterien zur Auswahl blutbasierter Biomarker für ein Ermüdungs- und Erholungsmonitoring**

Bei der Zusammenstellung eines Blutpanels für die Individualisierung der Leistungsdiagnostik sind bestimmte Kriterien entscheidend. Ein Parameter muss belastungsabhängig sein (Meyer et al. 2016), sowohl in Bezug auf die originalen Messwerte als auch auf die korrigierten Werte nach Plasmavolumenverschiebung. Zudem sollte der Parameter robust gegenüber Ausreißern sein und einen möglichst großen Anstieg nach der Belastung aufweisen (Meyer et al. 2016). Da der Testzeitpunkt am nächsten Morgen unmittelbar vor der nächsten Belastung (Springprüfung oder Transport) liegt und das Pferd zu diesem Zeitpunkt idealerweise vollständig erholt sein sollte, sind auch die Parameter von Interesse, die am Morgen nach der Belastung noch nicht wieder auf den Ausgangswert zurückgekehrt sind. Es ist ebenfalls wichtig zu verstehen, welchen physiologischen Prozess der Parameter widerspiegelt.

Obwohl der Vergleich mit Referenzbereichen für gesunde Pferde im Ruhezustand nicht zwingend erforderlich ist, um die Eignung eines Parameters für die Leistungsdiagnostik zu bewerten, ermöglicht er dennoch die Beurteilung der Veränderungen nach Belastung im klinischen Kontext. Der Vergleich zeigt auch, bei welchen Parametern die Referenzbereiche für gesunde Pferde in Ruhe nicht für Vielseitigkeitspferde nach Belastung gelten. Um Abweichungen dieser Parameter bei der Beurteilung von individuellen Blutergebnissen nicht fälschlicherweise als pathologisch zu bewerten, sollten mindestens für diese Parameter gruppenbasierte Referenzbereiche herangezogen werden.

### **4.2.1. Interpretation der Ergebnisse hinsichtlich Eignung als leistungsdiagnostischer Marker**

Die größten prozentualen Abweichungen 30 Minuten nach Belastungsende aller belastungsabhängigen Parameter weisen die folgenden zehn Parameter in absteigender Reihenfolge auf: Laktat, GLDH, Cortisol, cTnI, CK, T3, Kreatinin, HCT, Triglyceride, Anorganisches Phosphat. In Tabelle 3 werden die untersuchten Parameter hinsichtlich der Eignung als leistungsdiagnostischer Marker bewertet.

Bei den Parametern AST, CK, Cortisol, cTnI, HCT, HGB, Laktat, LDH, RBC und SAA sind zu mindestens einem Zeitpunkt Messwerte außerhalb der Referenzbereiche für gesunde Pferde in Ruhe zu erwarten. Um Abweichungen dieser Parameter bei der Untersuchung einzelner

Pferde zu bewerten, sollten die gruppenbasierten Referenzbereiche (Anhang, Tabelle 4) berücksichtigt werden.

#### **4.2.2. Marker für den Flüssigkeitshaushalt**

Es gab belastungsabhängige Veränderungen im Flüssigkeitshaushalt von Vielseitigkeitspferden nach der Geländeprüfung. Die größten prozentualen Abweichungen 30 Minuten nach Ende der Belastung zeigen sich in absteigender Reihenfolge bei HCT, RBC, HGB, SDMA, Harnstoff, Albumin, Gesamtprotein, Natrium und Chlorid. Alle Parameter sind als leistungsdiagnostische Parameter geeignet, da sie sowohl mit als auch ohne Adjustierung für die Plasmavolumenverschiebung belastungsabhängig reagieren. Für HCT, RBC, und HGB sind nach Belastung Werte außerhalb der Referenzbereiche für gesunde Pferde in Ruhe zu erwarten, was die Bedeutung der gruppenbasierten Referenzbereiche aus unserer Studie für diese Parameter unterstreicht.

#### **4.2.3. Marker für die Muskulatur**

Die Muskelenzyme CK und LDH zeigen nach der Geländeprüfung belastungsabhängige Erhöhungen über den Referenzbereich hinaus. Im Vergleich zu belastungsinduzierten Myopathien, anderen Pferdesportarten und früheren, deutlich längeren Geländeprüfungen sind die prozentualen Anstiege jedoch gering und die Werte sinken bereits innerhalb einer Nacht wieder ab. Die Muskelmetaboliten zeigen nach der Belastung unterschiedliche Reaktionen. Der Anstieg von Laktat und Kreatinin ist auf den erhöhten Muskelstoffwechsel zurückzuführen. Die Veränderungen der Elektrolytmengen werden erst durch die Anpassung der Plasmavolumenverschiebung sichtbar. Bei der Mehrheit der untersuchten Pferde waren alle Muskelmetabolite am nächsten Morgen wieder auf dem Ausgangsniveau.

Die größten prozentualen Abweichungen der muskelassoziierten Parameter 30 Minuten nach Belastungsende in absteigender Reihenfolge weisen Laktat, CK, Kreatinin, LDH, Calcium und anorganisches Phosphat auf. Der Parameter Magnesium ist nur bedingt als Ermüdungsmarker geeignet, da er zwar belastungsabhängig reagiert, dies aber nur mithilfe der Plasmaverschiebungsadjustierung ersichtlich wird. Die Parameter AST und Kalium reagieren nicht belastungsabhängig.

**Tabelle 3: Evaluierung der untersuchten blutbasierten Parameter**

Parameter	Belastungs- abhängigkeit	Adjustierung	Eignung*	Prozentuale Änderung**		
				10 min	30 min	nächster Morgen
Laktat	ja	nein	gut	1293	453	6
GLDH	ja	nein	gut		77	77
Cortisol	ja	nein	gut	68	60	-12
cTnl	ja	nein	gut		47	194
CK	ja	nein	gut		45	26
T3	ja	nein	gut		44	2
Creatinine	ja	nein	gut		31	5
HCT	ja	nein	gut	49	28	0
Triglyceride	ja	nein	gut		26	3
RBC	ja	nein	gut	43	25	2
$\alpha$ -Amylase	ja	nein	gut		25	0
T4	ja	nein	gut		25	0
HGB	ja	nein	gut	42	25	2
ALT	ja	nein	gut		22	16
LDH	ja	nein	gut		20	15
WBC	ja	nein	gut	26	19	9
Bilirubin	ja	nein	gut		15	12
Eisen	ja	nein	gut		14	-11
SDMA	ja	nein	gut	12	14	-2
Harnstoff	ja	nein	gut	8	9	6
Albumin	ja	nein	gut	10	7	1
Total Protein	ja	nein	gut	9	5	1
Cholesterin	ja	nein	gut		4	0
Globuline	ja	nein	gut		4	0
Calcium	ja	nein	gut		3	1
Natrium	ja	nein	gut		1	0
Chlorid	ja	nein	gut		-2	0
Anorg. Phosphat	ja	nein	gut		-26	-2
Vitamin E	ja	ja	bedingt***		6	8
DGGR-Lipase	ja	ja	bedingt***		1	2
Magnesium	ja	ja	bedingt***		-3	0
Zink	ja	ja	bedingt***		-3	-5
SOD	nein	nein	schlecht	42	38	20
GGT	nein	nein	schlecht		12	9
AST	nein	nein	schlecht		10	5
AP	nein	nein	schlecht		8	7
Selen	nein	nein	schlecht		7	1
Kupfer	nein	nein	schlecht		5	0
Kalium	nein	ja	schlecht		5	2
SAA	nein	ja	schlecht		-18	-24

\* Eignung als leistungsdiagnostischer Parameter für die Erstellung individueller Referenzbereiche für Vielseitigkeitspferde; \*\* Prozentuale Änderung verglichen mit Zeitpunkt "Pre" zum jeweiligen Zeitpunkt nach Belastungsende; \*\*\* Adjustierung nötig

#### **4.2.4. Marker für die Herzmuskulatur**

Der nach der Geländeprüfung beobachtete Anstieg der cTnI-Werte spiegelt Veränderungen in der Zellfunktion der Kardiomyozyten wider, was mit dem Konzept der kardialen Ermüdung vereinbar ist. Es ist anzumerken, dass die Definition der kardialen Ermüdung nicht notwendigerweise eine myokardiale Nekrose voraussetzt (Legaz-Arrese et al. 2015, Wijnberg und Franklin 2017), die in dieser Studie auch nicht beobachtet wurde. Daher können die in dieser Studie gemessenen erhöhten cTnI-Werte als Hinweis auf eine physiologische Manifestation der kardialen Ermüdung interpretiert werden.

Erhöhte cTnI-Werte sollten in jeden Fall angemessene Nachuntersuchungen nach sich ziehen, insbesondere wenn sie von Symptomen wie Schwäche, Leistungsabfall, Dyspnoe oder Synkope begleitet werden (Gresslien und Agewall 2016, Wijnberg und Franklin 2017).

cTnI ist als blutbasierter Marker für kardiale Ermüdung bei Vielseitigkeitspferden geeignet, da der Parameter belastungsabhängig ansteigt. Die prozentuale Änderung ist am nächsten Morgen am stärksten. Werte außerhalb des Referenzbereichs für gesunde Pferde in Ruhe sind sowohl 30 Minuten nach Belastungsende als auch am nächsten Morgen zu erwarten, was für cTnI die Nutzung der gruppenbasierten Referenzbereiche zur Interpretation individueller Werte nahelegt.

#### **4.2.5. Hormonelle Marker**

Cortisol, T3 und T4 zeigen einen kurzfristigen Anstieg nach dem Geländeritt. Cortisol ist am nächsten Morgen im Mittel niedriger als vor der Belastung.

Cortisol, T3 und T4 steigen belastungsabhängig an. Die Cortisolwerte übersteigen die Grenzen der Referenzbereiche für gesunde Pferde in Ruhe, weshalb auch bei Cortisol die gruppenbasierten Referenzbereiche bei der Interpretation individueller Werte beachtet werden sollten. Cortisol zeigt vor T3, gefolgt von T4 die größten prozentualen Abweichungen und damit die beste Eignung als hormoneller Marker für die definierten Kriterien.

#### **4.2.6. Marker für antioxidative Mechanismen**

Der geringe Anstieg der SOD-Werte kurz nach dem Ende der Belastung deutet darauf hin, dass die ROS-Produktion während der Belastung stattfindet und zur Aktivierung der antioxidativen Abwehrsysteme führt. Dies bedeutet jedoch nicht, dass eine Diskrepanz zwischen der ROS-Produktion und den antioxidativen Systemen besteht, was einen pathologischen oxidativen Stress darstellen könnte (Williams und Burk 2012).

Da ROS aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit schwer zu messen sind, muss in Feldstudien häufig auf die Messung von Stoffwechselprodukten und Cofaktoren zurückgegriffen werden (Bollinger et al. 2023).

SOD und Vitamin E sind nicht als Ermüdungsmarker geeignet, da SOD nicht belastungsabhängig und Vitamin E nur unter Adjustierung für die Plasmavolumenverschiebung belastungsabhängig reagiert.

#### **4.2.7. Entzündungsmarker**

Die Leukozyten steigen nach dem Geländeritt anhaltend an, während SAA nicht reagiert. WBC reagiert belastungsabhängig und ist somit als Ermüdungsmarker geeignet, wohingegen SAA nicht belastungsabhängig reagiert und deshalb als Ermüdungsmarker ungeeignet ist. Für SAA sind dennoch, anders als für WBC, Werte außerhalb der Referenzbereiche für gesunde Pferde in Ruhe zu erwarten.

#### **4.2.8. Marker für Metabolismus und Spurenelemente**

Alle leberassoziierten Parameter reagieren mit kurzfristigen (HGB, Globuline) oder anhaltenden Anstiegen (Bilirubin, GLDH, ALT). Die verdauungsassoziierten Parameter reagieren mit kurzzeitigen geringgradigen Erhöhungen ( $\alpha$ -Amylase, TG) oder Absenkungen (Cholesterin, DGGR-Lipase), die durch die Plasmavolumenverschiebungs-Anpassung deutlich werden. Zink zeigt eine kurzfristige Abnahme und Eisen eine verzögerte Abnahme. Generell sind bei Vielseitigkeitspferden nach Belastung bei den untersuchten Parametern zur Verdauung, Leberfunktion und bei den Spurenelementen keine Werte außerhalb der Referenzbereiche für gesunde Pferde in Ruhe zu erwarten. Die meisten der untersuchten Parameter sind prinzipiell als Ermüdungsmarker geeignet, da sie belastungsabhängig reagieren. Auszuschließen sind hierbei GGT, Selen, Kupfer und Zink, da sie nicht belastungsabhängig reagieren. Insgesamt sind die prozentualen Änderungen 30 Minuten nach Belastungsende jedoch nur für GLDH, ALT und Bilirubin (in absteigender Reihenfolge) oberhalb von 15 %.

### **4.3. Vergleich mit Erkenntnissen der humanen Leistungsdiagnostik**

Im Vergleich zum Projekt REGman, das als Referenzprojekt aus dem Bereich der humanen Leistungsdiagnostik dient, lassen sich einige Analogien feststellen. Klassische Ermüdungsindikatoren für menschliche Athleten sind das Muskelenzym CK zur Beurteilung der muskulären Mikroschädigung und Harnstoff zur Beurteilung der metabolischen Beanspruchung und des Proteinkatabolismus. CK und Harnstoff zeigten auch bei den in der vorliegenden Studie untersuchten Pferden eine signifikante Belastungsabhängigkeit. Somit sind diese Parameter auch beim Vielseitigkeitspferd für dieselben Implikationen geeignet. Die prozentualen Änderungen bei Harnstoff sind jedoch sowohl 30 Minuten nach Belastungsende als auch am nächsten Morgen unter 10 %.



Außerdem wird beim Menschen der Quotient aus freiem Testosteron und Cortisol berechnet, um eine Aussage über die anabol-katabole Balance zu erhalten (Urhausen et al. 1987, Urhausen et al. 1995). Da freies Testosteron in der vorliegenden Studie nicht gemessen wurde, konnte der Quotient nicht berechnet werden. Freies Cortisol war jedoch auch bei den Vielseitigkeitspferden in dieser Studie belastungsabhängig. Die Berechnung des Testosteron-Cortisol-Quotienten kann daher ein nächster, weiterführender Schritt in der zukünftigen Forschung bei Sportpferden sein.

#### **4.4. Diskussion zur Ermüdung und Erholung**

Es ergeben sich Schwierigkeiten aus der Definition und Messbarkeit von Ermüdung. In der humanen Leistungsdiagnostik hat sich gezeigt, dass standardisierte Belastungstests (SETs) eine präzisere Abschätzung des aktuellen Ermüdungszustandes erlauben als Wettbewerbe (Urhausen et al. 1998, Meeusen et al. 2013). Die zusätzliche Belastung der AthletInnen durch SETs führt jedoch dazu, dass dieses Vorgehen nicht für eine routinemäßige Anwendung geeignet ist.

Bei der Messung von Ermüdung anhand von Turnierprüfungen muss berücksichtigt werden, dass nicht jede Prüfung für jedes Pferd zu einem maximal ermüdeten Zustand führt. Nach der Definition von Degens und Veerkamp (1994) ist eine Ermüdung erst dann erreicht, wenn das Pferd die gestellte Aufgabe, beispielsweise das Überwinden von Hindernissen im Galopp, nicht mehr in derselben Ausführung durchführen kann. Ermüdung ist aber als kontinuierlich fortschreitender Prozess zu betrachten (Ament und Verkerke 2009), was die Beurteilung erschwert. Es bleibt daher zunächst unklar, inwieweit und in welchem Ausmaß im verwendeten Versuchsaufbau tatsächlich von einer Ermüdung der Pferde ausgegangen werden kann. Hilfreich könnte die Beurteilung der Schrittfrequenz und der Schrittlänge, sowie der Vergleich mit Geschwindigkeitsdaten am Ende der Geländestrecke sein, um zu bestimmen, inwieweit das einzelne Pferd am Ende der Geländestrecke ermüdet.

Die Entstehung von Ermüdung beruht allerdings auf der Überlastung bestimmter physiologischer Prozesse (Ament und Verkerke 2009), wodurch es zu einer Anhäufung von physiologischen Zwischenprodukten (Wärme, Wasserstoffionen, Phosphationen, Laktat, Ammoniak) kommt, die nicht in der gleichen Geschwindigkeit abgebaut werden können, in der sie entstehen (Ament und Verkerke 2009). Durch die Messung physiologischer Zwischenprodukte könnte der Grad der Ermüdung im Vergleich zu anderen Individuen zu einem bestimmten Zeitpunkt abgeschätzt werden. Somit müsste der Trainingszustand anhand des Ausmaßes der unmittelbaren Ermüdung und der Regenerationsgeschwindigkeit im Vergleich zu anderen Individuen beurteilbar sein.

#### **4.5. Beurteilung der Ermüdung und Erholung in der Studienpopulation**

Kurz nach der Geländeprüfung zeigen sich belastungsabhängige Veränderungen bei fast allen untersuchten Parametern. Die veränderten Werte nach Belastungsende bilden die Anhäufung von Metaboliten ab, zu der es bei der Ausführung ermüdender Aktivitäten kommt.

Die Erholung ist entsprechend für die Organsysteme, bei denen noch Abweichungen vom Zeitpunkt vor der Belastung messbar sind, zum dem jeweiligen späteren Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen. Nach einer Erholungsnacht waren die Parameter CK, LDH, Harnstoff, cTnI, Bilirubin, GLDH, ALT und WBC signifikant erhöht, während Cortisol und Eisen signifikant erniedrigt waren. Alle anderen untersuchten Parameter hatten wieder die Werte vor der Belastung erreicht oder hatten sich nicht belastungsabhängig verändert. Die Erholung ist also für die Parametergruppen Skelett- und Herzmuskel, Leber und Entzündung am nächsten Morgen noch nicht abgeschlossen. Dahingegen sind für die untersuchten Parameter zu oxidativem Stress, Verdauung und Flüssigkeitshaushalt am nächsten Morgen keine Ermüdungsanzeichen mehr ablesbar.

Die Muskelenzyme CK und LDH liegen nach der Belastung über dem Referenzbereich für gesunde Pferde in Ruhe, aber sinken bereits innerhalb einer Nacht ab, was auf einen geringen Grad an Muskelfaserschädigung und muskulärer Ermüdung am nächsten Morgen hinweist. Der Anstieg der WBC persistiert bis zum nächsten Morgen, was darauf schließen lässt, dass die Erholung von der Belastung noch nicht abgeschlossen ist.

Der Anstieg des cTnI am Morgen nach der Belastung liefert einen Hinweis auf kardiale Ermüdung. Das verzögerte Freisetzungsmuster von cTnI (Durando et al. 2006, Rossi et al. 2019) verkompliziert allerdings die Bewertung der Erholung zwischen dem Ende der Geländeprüfung und dem nächsten Morgen. Weitere Forschung muss zeigen, ob zusätzliche Verfahren notwendig sind, um die Erholung von der belastungsinduzierten kardialen Ermüdung zu bewerten (z.B. Echokardiographie).

Im Fall der Leberenzyme GLDH und ALT wird die Beurteilung der Erholung durch die mehrere Stunden andauernde Halbwertszeit der Enzyme erschwert (EclinPath). Es wurde beobachtet, dass die GLDH-Konzentration bei Pferden nach Leberschädigung über längere Zeit konstant bleibt, bevor sie wieder absinkt (EclinPath). Ob die Enzyme GLDH und ALT zur Beurteilung der Erholung sinnvoll sind, ist deshalb fraglich. Weitere Forschung sollte den Mechanismus hinter dem belastungsinduzierten Anstieg der Enzyme GLDH und ALT beleuchten.

## 4.6. Limitationen

Beide Artikel unterliegen denselben Einschränkungen. Die Auswahl der Blutparameter war auf etablierte Parameter beschränkt, was bedeutet, dass einige Organsysteme nicht umfassend untersucht wurden (Mair et al. 2015, Wijnberg und Franklin 2017).

Um der Kinetik der einzelnen Blutparameter zu entsprechen, hätten mehrere Blutproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen werden müssen (Brancaccio et al. 2006). Insbesondere für cTnl wäre eine Messung 4 bis 10 Stunden nach Belastungsende sinnvoll gewesen. Der Zeitpunkt des cTnl-Peaks ist entscheidend für die Beurteilung einer potenziellen Myokardschädigung (Baker et al. 2019). Ob Vielseitigkeitspferde nach Geländeprüfungen Anzeichen einer Myokardschädigung in Form eines erhöhten cTnl aufweisen, hätte also durch mehrere Messungen zwischen 4 und 10 Stunden nach Belastungsende beantwortet werden können. Die Messung 30 Minuten nach Belastungsende und 11 bis 21 Stunden nach Belastungsende ist für die Beantwortung dieser Fragestellung unzureichend geeignet.

Die unterschiedliche Zeitspanne zwischen der Messung 30 Minuten nach der Belastung und der nächsten Messung am nächsten Morgen (11 bis 21 Stunden später) könnte die Ergebnisse zusätzlich beeinflusst haben (EclinPath). Da die meisten der untersuchten Parameter eine Halbwertszeit von unter 10 Stunden haben (EclinPath), könnten die Werte nach 21 Stunden deutlich niedriger gemessen worden sein, als es nach 11 Stunden der Fall gewesen wäre.

Darüber hinaus war die Anzahl der Pferde in der Studie zu gering, um Referenzwerte gemäß den Richtlinien der American Society for Veterinary Clinical Pathology zur Festlegung von Referenzintervallen bei Tierarten zu ermitteln (Friedrichs et al. 2012). Die gruppenbasierten Konfidenzintervalle sind außerdem nur so lange gültig, wie die Prüfungsanforderungen in der Geländeprüfung unverändert bleiben.

Eine wichtige Einschränkung der Studie besteht darin, dass die statistische Analyse nicht über die Ebene der Mittelwerte hinausgeht. Obwohl das gemischte Modell die Möglichkeit bietet, viele einflussnehmende Umweltfaktoren in die Datenanalyse einzubeziehen, arbeitet es auf der Basis von Mittelwerten und erlaubt keine Identifikation von Individuen, die von diesen Mittelwerten abweichen (Hecksteden et al. 2015, Meyer et al. 2016, Hecksteden et al. 2017, Julian et al. 2017, Hecksteden und Meyer 2018, Hecksteden et al. 2018, Barth et al. 2019, Meyer et al. 2020, Hacker et al. 2021). Dies könnte jedoch für spätere Fragestellungen von Interesse sein und mit Hilfe der Bayes'schen Statistik erreicht werden (Barth et al. 2019).

Es ist wichtig, Laborwerte in Kombination mit anderen nicht-blutbasierten Messgrößen wie Herzfrequenz, Geschwindigkeit oder anderen trainingsphysiologischen Variablen zu interpretieren (Meyer et al. 2016, Meyer et al. 2020). Durch die Integration verschiedener Messgrößen kann ein umfassenderes leistungsdiagnostisches Panel erstellt werden.

#### **4.7. Methodische Implikationen**

Für zukünftige Untersuchungen kann die Methode zur Adjustierung von Blutwerten für die Plasmavolumen-verschiebung nach körperlicher Belastung genutzt werden, um weitere blutbasierte Marker auf ihre Belastungsabhängigkeit zu untersuchen. Diese Methode ermöglicht eine Differenzierung, ob belastungsabhängige Parameter aufgrund ihrer physiologischen Funktion oder lediglich aufgrund von Konzentrationsänderungen infolge von Verschiebungen im Flüssigkeitshaushalt belastungsabhängig erscheinen.

Die abgeleiteten gruppenbasierten Mittelwerte und deren Konfidenzintervalle bieten Vergleichswerte für die untersuchte Population, um zukünftig gemessene Werte einzelner Individuen zu vergleichen.

Die Auswahl der Parameter für die Erstellung individueller Referenzbereiche für die leistungsdiagnostische Betreuung von Vielseitigkeitspferden, die auf vergleichbarem Niveau starten, kann auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit erfolgen.

#### **4.8. Ausblick auf zukünftige Forschung**

In der vorliegenden Studie konnte zwar ein cTnI-Anstieg nach Belastung beobachtet werden. Um zu beurteilen, ob der cTnI-Anstieg auf eine pathologische Ausprägung der kardialen Ermüdung hindeutet, sind mehrere cTnI-Messungen nach der Belastung und echokardiografische Untersuchungen, einschließlich Myokardfunktionsmessungen, erforderlich. Weitere Forschung könnte außerdem zeigen, ob andere Verfahren geeigneter sind, um die Erholung von belastungsinduzierter kardialer Ermüdung abzubilden.

Einige der untersuchten Blutparameter sind für eine kurzfristige Beurteilung von Ermüdung und Erholung nur bedingt geeignet (z.B. AST), weil sie nicht belastungsabhängig reagieren. Diese Parameter können aber belastungsunabhängig Veränderungen des Trainingszustandes im Saisonverlauf abbilden. Es ist beispielsweise bekannt, dass trainierte Pferde höhere AST-Ruhewerte haben als untrainierte Pferde (EclinPath). Die AST-Ruhewerte lagen auch in der vorliegenden Studie oberhalb des Referenzbereichs für gesunde Pferde in Ruhe und könnten deshalb einen Trainingseffekt abbilden.

Miglio et al. (2020) konnten auch für LDH bei jungen Rennpferden in der ersten Trainingssaison eine sukzessive Erhöhung der Werte im Längsschnitt über mehrere Monate hinweg beobachten. LDH könnte deshalb ebenfalls ein interessanter Biomarker sein, um die Trainingsbelastung der Vielseitigkeitspferde über die Saison hinweg einzuschätzen.

Darüber hinaus sollten in Zukunft zusätzliche statistische Methoden eingesetzt werden, um Individuen zu identifizieren, die von den in dieser Studie gemessenen gruppenbasierten

Mittelwerten abweichen. Denn diese Individuen sind es, die aus medizinischer Sicht besonderer Aufmerksamkeit bedürfen. Neu auftretende Abweichungen könnten dann als Hinweis auf eine subklinische Erkrankung oder eine negative Entwicklung des Trainingszustandes interpretiert werden.

Eine Bayes'sche Statistik nach dem Vorbild der humanen Leistungsdiagnostik sollte angewendet werden, um auf der Basis gruppenbasierter Konfidenzintervalle (Tabelle 4) in wiederholten Messungen an denselben Pferden individuelle Referenzbereiche für ausgewählte Blutparameter zu ermitteln.

#### **4.9. Konklusion zum Gesamtprojekt**

In der vorliegenden Untersuchung werden die physiologischen Anpassungen hochklassiger Geländepferde an eine ermüdende körperliche Belastung analysiert. Die submaximale Belastung einer internationalen Geländeprüfung führt zu einer Milzkontraktion, einer Plasmavolumenverschiebung von intravasal nach extravasal, sowie zu hormonellen, antioxidativen, inflammatorischen und metabolischen Anpassungen und zu einer vermehrten Beanspruchung der Skelett- und Herzmuskulatur.

Viele der untersuchten Blutparameter reagieren bei Vielseitigkeitspferden belastungsabhängig, auch wenn der Konzentrationseffekt durch die Plasmavolumenverschiebung berücksichtigt wird. Die stärksten prozentualen Abweichungen vom Zustand vor der Belastung weisen 30 Minuten nach Belastungsende die folgenden Parameter in absteigender Reihenfolge auf: Laktat, GLDH, Cortisol, cTnI, CK, T3, Kreatinin, HCT, Triglyceride, Anorg. Phosphat. Die Anpassung für die Plasmavolumenverschiebung auf der Grundlage der Albuminkonzentration verdeutlichte erfolgreich die Auswirkungen der Plasmavolumenverschiebung auf die Konzentration der Blutparameter.

Die ermittelten gruppenbasierten Konfidenzintervalle für mehrere Zeitpunkte innerhalb der Erholungsphase bieten wichtige Vergleichswerte für Vielseitigkeitspferde nach Belastung. Der Vergleich der gruppenbasierten Konfidenzintervalle mit Referenzbereichen für gesunde Pferde in Ruhe ergab, dass bei Vielseitigkeitspferden nach Belastung für die Parameter AST, CK, Cortisol, cTnI, HCT, HGB, Laktat, LDH, RBC und SAA ein Anstieg über die Referenzbereiche für gesunde Pferde in Ruhe zu erwarten ist. Für die Parameter Vitamin E, Globuline, ALT,  $\alpha$ -Amylase, AP, Cholesterol, SDMA sind hingegen nur Werte innerhalb der Referenzbereiche für gesunde Pferde in Ruhe zu erwarten.

Die Arbeit liefert Erkenntnisse über den Einfluss von Ermüdung und Erholung auf ausgewählte Blutparameter und bildet somit eine notwendige Basis für die Individualisierung der Leistungsdiagnostik. Die Ergebnisse tragen somit zur Weiterentwicklung der Leistungsdiagnostik für Vielseitigkeitspferde bei und helfen dadurch, das Verletzungsrisiko für Mensch und Tier in dieser Disziplin zu verringern.

## V. Zusammenfassung

Johanna Clara Giers

### **Ermüdungs- und Erholungsmonitoring bei Vielseitigkeitspferden nach Geländeprüfungen - Eignung blutbasierter Biomarker für die Leistungsdiagnostik**

Die Disziplin „Vielseitigkeit“ steht aufgrund von Stürzen während anspruchsvoller Geländeprüfungen zunehmend in der öffentlichen Kritik. Die Geländeprüfung auf internationalem 2-Sterne- bis 4-Sterne-Niveau entspricht einer submaximalen Belastung. Die Erfassung blutbasierter Ermüdungs- und Erholungsmarker liefert quantifizierbare und objektive Ergebnisse. Eine Individualisierung der Referenzbereiche für ausgewählte Parameter kann die Leistungsdiagnostik verbessern. Ein Parameter ist dann für eine Individualisierung geeignet, wenn er belastungsabhängig ansteigt und mit einem belastungsrelevanten physiologischen Vorgang zusammenhängt. Die Erstellung gruppenbasierter Referenzbereiche für ausgewählte Zeitpunkte vor und nach Belastung ist der erste Schritt der Individualisierung, da die Blutwerte bei Vielseitigkeitspferden nach Geländeritten regelmäßig von den Referenzbereichen für gesunde Pferde in Ruhe abweichen. Während der Geländeritte kommt es zu einer Kontraktion der Milz und zu einer Plasmavolumenverschiebung von intravasal nach extravasal. Eine Adjustierung der Blutwerte mithilfe der Albuminkonzentration verbessert die Beurteilung der Belastungsabhängigkeit der untersuchten Blutparameter. Die größten prozentualen Abweichungen 30 Minuten nach Belastungsende aller belastungsabhängigen Parameter weisen die folgenden zehn Parameter in absteigender Reihenfolge auf: Laktat, GLDH, Cortisol, cTnI, CK, T3, Kreatinin, HCT, Triglyceride, Anorganisches Phosphat. Die Beurteilung der Ermüdung ist im verwendeten Versuchsaufbau nicht allein anhand von Blutwerten möglich. Eine weitere Einschränkung der Studie besteht darin, dass die statistische Analyse nicht über die Ebene von Mittelwerten hinausgeht und eine Identifikation auffälliger Pferde deshalb nicht möglich ist. Um zu beurteilen, ob der gemessene cTnI-Anstieg ein Hinweis auf pathologische kardiale Ermüdung bei Vielseitigkeitspferden ist, sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Eine Analyse der blutbasierten leistungsdiagnostischen Marker sollte im Saisonlängsschnitt erfolgen und zusätzliche nicht-blutbasierte Messwerte sollten in die Beurteilung von Ermüdung und Erholung einbezogen werden.

## VI. Summary

Johanna Clara Giers

### **Fatigue and Recovery Monitoring in Eventing Horses after Cross-Country Trials - Suitability of Blood-Based Biomarkers for Performance Diagnostics**

The discipline of eventing has faced increasing public scrutiny due to falls during challenging cross-country trials. Cross-country trials at international 2- to 4-star level correspond to submaximal exercise. Quantifiable and objective results are provided by the measurement of blood-based fatigue and recovery markers. Personalising reference ranges for selected parameters can enhance performance diagnostics. A parameter is suitable for personalisation when it increases in response to exercise and is associated with a relevant physiological process during exercise. Establishing group-based reference ranges for selected time points before and after exercise is the first step in personalisation, as blood values in eventing horses after cross-country trials regularly deviate from those of healthy horses at rest. During cross-country trials, there is spleen contraction and a shift in plasma volume from intravascular to extravascular compartments. Adjusting blood values using albumin concentration enhances the assessment of the exercise dependency of the examined blood parameters. The ten parameters with the greatest percentage deviations 30 minutes after the end of exertion, in descending order, are lactate, GLDH, cortisol, cTnI, CK, T3, creatinine, HCT, triglycerides, and inorganic phosphate. However, it is not possible to assess fatigue on the basis of blood values alone in this study design. Another limitation of the study is that the statistical analysis does not extend beyond mean values, thus preventing the identification of "conspicuous" horses. Further investigations are needed to determine whether the measured cTnI increase indicates pathological cardiac fatigue in eventing horses. Analysis of blood-based performance diagnostic markers should be conducted longitudinally throughout the season, and additional non-blood-based metrics should be incorporated into the assessment of fatigue and recovery.

## VII. Anhang

**Tabelle 4: Gruppenbasierte 95 % Konfidenzintervalle aller untersuchten blutbasierten Marker**

Parameter	Referenzbereich*	Einheit	95 % Konfidenzintervall der EMM			
			vor Belastung (n=55)	10 min** (n=55)	30 min** (n=55)	nächster Morgen*** (n=54)
α-Amylase	< 50	U/l	3 - 5	n.m.	5 - 6	3 - 5
Albumin	25 - 54	g/l	32.9 - 35.2	36.3 - 38.6	35.3 - 37.6	33.3 - 35.6
ALT	< 70	U/l	6.0 - 8.1	n.m.	7.2 - 9.7	6.9 - 9.2
Anorg. Phosphat	0.7 - 1.5	mmol/l	1.0 - 1.2	n.m.	0.7 - 1.0	1.0 - 1.2
AP	< 450	U/l	94 - 147	n.m.	103 - 156	102 - 155
AST	< 250	U/l	178 - 295	n.m.	195 - 316	186 - 309
Bilirubin	8.6 - 59.9	µmol/l	22.2 - 29.7	n.m.	26.3 - 33.8	25.4 - 32.9
Calcium	2.5 - 3.4	mmol/l	3.0 - 3.1	n.m.	3.1 - 3.2	3.0 - 3.1
Chlorid	95 - 105	mmol/l	99 - 101	n.m.	97 - 100	100 - 102
Cholesterol	1.8 - 4.7	mmol/l	2.3 - 2.6	n.m.	2.4 - 2.7	2.3 - 2.7
CK	< 190	U/l	102 - 170	n.m.	148 - 245	129 - 219
Cortisol	< 50	ng/ml	38.3 - 46.9	67.3 - 75.8	64.0 - 72.6	33.0 - 41.6
cTnl	< 0.03	ng/ml	0.01 - 0.04	n.m.	0.01 - 0.05	0.04 - 0.09
DGGR-Lipase	< 20	U/l	14.2 - 17.6	n.m.	14.4 - 17.8	14.5 - 17.9
Eisen	17.9 - 64.5	µmol/l	21.8 - 25.9	n.m.	25.3 - 29.3	19.3 - 23.4
GGT	< 25	U/l	11.0 - 17.4	n.m.	12.0 - 19.5	12.0 - 19.1
GLDH	< 8	U/l	1.0 - 1.8	n.m.	1.7 - 3.2	1.7 - 3.1
Globuline	< 51	g/l	26.2 - 29.8	n.m.	27.2 - 30.7	26.2 - 29.8
Harnstoff	3.3 - 6.7	mmol/l	4.53 - 5.46	4.91 - 5.84	4.97 - 5.91	4.83 - 5.77
HCT	30.0 - 40.0	%	34.8 - 38.0	52.7 - 56.0	45.0 - 48.3	34.9 - 38.2
HGB	107 - 165	g/L	124 - 134	178 - 188	156 - 166	126 - 136
Kalium	2.8 - 4.5	µg/l	3.1 - 3.6	n.m.	3.3 - 3.7	3.2 - 3.6
Kreatinin	71 - 159	µmol/l	88 - 102	n.m.	117 - 131	93 - 106
Kupfer	7.9 - 21.0	µmol/l	13.0 - 16.1	n.m.	13.7 - 16.7	13.0 - 16.1
Laktat	< 0.9	mmol/l	0.5 - 0.9	7.4 - 12.0	2.9 - 4.8	0.6 - 0.9
LDH	< 400	U/l	321 - 405	n.m.	395 - 479	376 - 460
Magnesium	0.5 - 0.9	mmol/l	0.7 - 0.8	n.m.	0.7 - 0.7	0.7 - 0.8
Natrium	125 - 150	mmol/l	137 - 139	n.m.	138 - 140	137 - 140
RBC	6.40 - 10.40	x10 <sup>12</sup> /L	7.41 - 7.98	10.74 - 11.31	9.36 - 9.94	7.59 - 8.17
SAA	< 7.0	µg/ml	3.21 - 9.50	n.m.	2.57 - 7.83	2.35 - 7.30
SDMA	< 0.75	µmol/l	0.349 - 0.406	0.393 - 0.450	0.401 - 0.458	0.341 - 0.398
Selen	100 - 200	µg/l	136 - 162	n.m.	146 - 172	137 - 163
SOD	n.v.	U/ml	1.18 - 2.07	1.68 - 2.94	1.63 - 2.84	1.42 - 2.48
T3	25 - 180	ng/dl	49.0 - 63.1	n.m.	70.8 - 89.1	50.1 - 64.6
T4	1.3 - 4.1	µg/dl	1.4 - 1.9	n.m.	1.8 - 2.2	1.4 - 1.8
TP	55 - 75	g/l	60.6 - 63.5	65.9 - 68.9	63.9 - 66.9	60.9 - 63.9
Triglyceride	< 0.97	mmol/l	0.27 - 0.35	n.m.	0.35 - 0.44	0.28 - 0.36
Vitamin E	> 1.0	mg/l	3.0 - 4.2	n.m.	3.2 - 4.4	3.2 - 4.5
WBC	4.90 - 11.10	x10 <sup>9</sup> /L	6.69 - 8.28	8.60 - 10.19	8.12 - 9.71	7.37 - 8.96
Zink	9.2 - 19.9	µmol/l	11.9 - 14.3	n.m.	11.5 - 14.0	11.3 - 13.7

Parameter in alphabetischer Ordnung; EMM = Estimated marginal mean; n.m. = nicht gemessen; n.v. = nicht verfügbar; \* Referenzbereich für gesunde Pferde in Ruhe gemäß auswertendem Labor; \*\* nach Belastungsende, \*\*\* 11 bis 21 Stunden nach Belastungsende



---

## VIII. Literaturverzeichnis

- Alpert, J. S., K. Thygesen, E. Antman und J. P. Bassand (2000). "Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction." *J Am Coll Cardiol* 36(3): 959-969.
- Ament, W. und G. J. Verkerke (2009). "Exercise and fatigue." *Sports Med* 39(5): 389-422.
- Amory, H., T. Art, A. Linden, D. Desmecht, M. Buchet und P. Lekeux (1993). "Physiological response to the cross-country phase in eventing horses." *J Equine Vet Sci* 13(11): 646-650.
- Andrews, F. M., D. R. Geiser, S. L. White, L. H. Williamson, P. L. Maykuth und E. M. Green (1995). "Haematological and biochemical changes in horses competing in a 3 Star horse trial and 3-day-event." *Equine Vet J Suppl*(20): 57-63.
- Arfuso, F., C. Giannetto, F. Fazio, F. Panzera und G. Piccione (2020). "Training Program Intensity Induces an Acute Phase Response in Clinically Healthy Horses." *J Equine Vet Sci* 88.
- Arfuso, F., C. Giannetto, E. Giudice, F. Fazio, M. Panzera und G. Piccione (2021). "Peripheral Modulators of the Central Fatigue Development and Their Relationship with Athletic Performance in Jumper Horses." *Animals (Basel)* 11(3).
- Art, T., T. Franck, M. Gangl, D. Votion, S. Kohnen, G. Deby-Dupont und D. Serteyn (2006). "Plasma concentrations of myeloperoxidase in endurance and 3-day event horses after a competition." *Equine Vet J Suppl* (36): 298-302.
- Assunção, P., T. Barbosa, L. Yonezawa, L. Barbosa, M. Watanabe, A. Kohayagawa und E. Schmidt (2019). "Acute-phase protein profile in horses subjected to different exercise protocols." *Can J Vet Res* 83(4): 272-278.
- Baker, P., T. Leckie, D. Harrington und A. Richardson (2019). "Exercise-induced cardiac troponin elevation: An update on the evidence, mechanism and implications." *Int J Cardiol Heart Vasc* 22: 181-186.
- Barth, V., H. Käsbauer, A. Ferrauti, M. Kellmann, M. Pfeiffer, A. Hecksteden und T. Meyer (2019). "Individualized Monitoring of Muscle Recovery in Elite Badminton." *Front Physiol* 10: 778.
- Bennet, E. D., H. Cameron-Whytock und T. D. Parkin (2023). "Fédération Equestre Internationale eventing: Fence-level risk factors for falls during the cross-country phase (2008–2018)." *Equine Vet J* 55(3): 463-473.

- Bollinger, L., A. Bartel, A. Kuper, C. Weber und H. Gehlen (2021). "Age and Hydration of Competing Horses Influence the Outcome of Elite 160 km Endurance Rides." *Front Vet Sci* 8: 668650.
- Bollinger, L., A. Bartel, C. Weber und H. Gehlen (2023). "Pre-Ride Biomarkers and Endurance Horse Welfare: Analyzing the Impact of the Elimination of Superoxide Dismutase, delta-Aminolevulinic-Dehydratase, Thiobarbituric Acid Reactive Substances, Iron, and Serum Amyloid A Levels in Elite 160 km Endurance Rides." *Animals* 13(10): 1670.
- Brancaccio, P., F. M. Limongelli und N. Maffulli (2006). "Monitoring of serum enzymes in sport." *Br J Sports Med* 40(2): 96-97.
- Carakostas, M. C., W. E. Moore und J. E. Smith (1981). "Intravascular neutrophilic granulocyte kinetics in horses." *Amer J Vet Res* 42(4): 623-625.
- Carvalho Filho, W. P., L. A. Fonseca, F. M. Girardi, L. D. Bento, P. C. Souto und A. M. O. Orozco (2019). "Serum amyloid a and muscle activity biomarkers in horses submitted to equestrian show jumping." *Pesqui Vet Bras* 39(8): 668-671.
- Claessen, G., P. Claus, S. Ghysels, P. Vermeersch, S. Dymarkowski, A. La Gerche und H. Heidbuchel (2014). "Right Ventricular Fatigue Developing during Endurance Exercise: An Exercise Cardiac Magnetic Resonance Study." *Med Sci Sports Exerc* 46(9): 1717-1726.
- Clarkson, P. M. und M. J. Hubal (2002). "Exercise-induced muscle damage in humans." *Am J Phys Med Rehabil* 81(11 Suppl): S52-69.
- Cywinska, A., R. Gorecka, E. Szarska, L. Witkowski, P. Dziekan und A. Schollenberger (2010). "Serum amyloid A level as a potential indicator of the status of endurance horses." *Equine Vet J Suppl*: 23-27.
- Cywinska, A., E. Szarska, R. Górecka, L. Witkowski, M. Hecold, A. Bereznowski, A. Schollenberger und A. Winnicka (2012). "Acute phase protein concentrations after limited distance and long distance endurance rides in horses." *Res Vet Sci* 93(3): 1402-1406.
- Degens, H. und D. A. Jones (2020). "Are Force Enhancement after Stretch and Muscle Fatigue Due to Effects of Elevated Inorganic Phosphate and Low Calcium on Cross Bridge Kinetics?" *Medicina (Kaunas)* 56(5).
- Degens, H. und J. H. Veerkamp (1994). "Changes in oxidative capacity and fatigue resistance in skeletal muscle." *Int J Biochem* 26(7): 871-878.

- Dissmann, R., T. Linderer und R. Schröder (1998). "Estimation of enzymatic infarct size: Direct comparison of the marker enzymes creatine kinase and  $\alpha$ -hydroxybutyrate dehydrogenase." *Am Heart J* 135(1): 1-9.
- Durando, M. M., V. B. Reef, K. Kline und E. K. Birks (2006). "Acute effects of short duration, maximal exercise on cardiac troponin I in healthy horses." *Comp Exerc Physiol* 3(4): 217-223.
- EclinPath. from <https://eclinpath.com/>, Cornell University, Zuletzt geöffnet 27.05.2023
- Edwards, R. H. (1981). "Human muscle function and fatigue." *Ciba Found Symp* 82: 1-18.
- Ertelt, A., R. Merle, F. Stumpff, L. Bollinger, S. Liertz, C. Weber und H. Gehlen (2021). "Evaluation of Different Blood Parameters From Endurance Horses Competing at 160 km." *J Equine Vet Sci* 104.
- Ertelt, A., F. Stumpff, R. Merle, S. Kuban, L. Bollinger, S. Liertz und H. Gehlen (2021). "Asymmetric dimethylarginine—A potential cardiac biomarker in horses." *J Vet Cardiol* 33: 43-51.
- Fazio, E., A. Lindner, C. Cravana, J. Wegener, P. Medica, U. Hart-Mann und A. Ferlazzo (2022). "Effects of Standardized Exercise Tests on Plasma Thyroid Hormones' Kinetics in Standardbred Racehorses." *J Equine Vet Sci* 110: 103853.
- Fazio, E., P. Medica, C. Cravana, R. Pellizzotto, S. Fragalà und A. Ferlazzo (2015). "Dynamics of Total and Free Iodothyronines of Jumping Horses on the Responses to Competition and Transport." *J Equine Vet Sci* 35(1): 49-53.
- FEI, Fédération Equestre Internationale (2022). *Eventing Rules*. 25th Edition.
- Ferlazzo, A., C. Cravana, E. Fazio und P. Medica (2018). "Is There an Interplay Between the Hypothalamus-Pituitary-Thyroid and the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axes During Exercise-Stress Coping in Horses?" *J Equine Vet Sci* 62: 85-97.
- Ferlazzo, A., C. Cravana, E. Fazio und P. Medica (2020). "The different hormonal system during exercise stress coping in horses." *Vet World* 13(5): 847-859.
- Flethøj, M., J. K. Kanters, M. M. Haugaard, P. J. Pedersen, H. Carstensen, J. D. Balling, L. H. Olsen und R. Buhl (2016). "Changes in heart rate, arrhythmia frequency, and cardiac biomarker values in horses during recovery after a long-distance endurance ride." *J Am Vet Med Assoc* 248(9): 1034-1042.
- Flethøj, M., C. C. Schwarzwald, M. M. Haugaard, H. Carstensen, J. K. Kanters, L. H. Olsen und R. Buhl (2016). "Left Ventricular Function After Prolonged Exercise in Equine Endurance Athletes." *J Vet Intern Med* 30(4): 1260-1269.

- Friedrichs, K. R., K. E. Harr, K. P. Freeman, B. Szladovits, R. M. Walton, K. F. Barnhart und J. Blanco-Chavez (2012). "ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics." *Vet Clin Pathol* 41(4): 441-453.
- Fromm, R. E. und R. Roberts (2001). "Sensitivity and specificity of new serum markers for mild cardioneclerosis." *Curr Probl Cardiol* 26(4): 241-284.
- Gandevia, S. C. (2001). "Spinal and Supraspinal Factors in Human Muscle Fatigue." *Physiological Reviews* 81(4): 1725-1789.
- Gehlen, H., K. Rohn, E. Deegen und P. Stadler (2006). "Analysis of laboratory values in horses with cardiac disease: Diagnostic value of different cardiac biomarkers." *Pferdeheilkunde* 22: 532-541.
- Gehlen, H., T. Shety, H. El-Zahar und I. Hofheinz (2018). "Measurement of plasma endothelin-1 concentration in healthy horses and horses with cardiac disease during rest and after exercise." *J Vet Med Sci.* 81(2):263-268.
- George, K., G. P. Whyte, D. J. Green, D. L. Oxborough, R. E. Shave, D. C. Gaze und J. Somauroo (2012). "The endurance athletes heart: acute stress and chronic adaptation." *Br J Sports Med.* 2012 Nov;46 Suppl 1:i29-36.
- Giori, L., P. Moretti, A. Giordano und S. Paltrinieri (2011). "Short-term Evaluation of Serum Amyloid A after Exercise in Clinically Healthy Horses." *J Equine Vet Sci* 31(9): 499-501.
- González, O., E. González, C. Sánchez, J. Pinto, I. González, O. Enríquez, R. Martínez, G. Filgueira und A. White (1998). "Effect of exercise on erythrocyte  $\beta$ -adrenergic receptors and plasma concentrations of catecholamines and thyroid hormones in Thoroughbred horses." *Equine Vet J* 30(1): 72-78.
- Gresslien, T. und S. Agewall (2016). "Troponin and exercise." *Int J Cardiol* 221: 609-621.
- Gunther-Harrington, C. T., R. Arthur, K. Estell, B. Martinez Lopez, A. Sinnott, E. Ontiveros, A. Varga und J. A. Stern (2018). "Prospective pre- and post-race evaluation of biochemical, electrophysiologic, and echocardiographic indices in 30 racing thoroughbred horses that received furosemide." *BMC Vet Res* 14(1).
- Hacker, S., T. Reichel, A. Hecksteden, C. Weyh, K. Gebhardt, M. Pfeiffer, A. Ferrauti, M. Kellmann, T. Meyer und K. Krüger (2021). "Recovery-Stress Response of Blood-Based Biomarkers." *Int J Environ Res Public Health* 18(11): 5776.
- Hecksteden, A., J. Kraushaar, F. Scharhag-Rosenberger, D. Theisen, S. Senn und T. Meyer (2015). "Individual response to exercise training - a statistical perspective." *J Appl Physiol* 118(12): 1450-1459.

- Hecksteden, A. und T. Meyer (2018). "Personalized Sports Medicine – Principles and tailored implementations in preventive and competitive sports." *Dtsch Z Sportmed* 2018: 73-80.
- Hecksteden, A., W. Pitsch, R. Julian, M. Pfeiffer, M. Kellmann, A. Ferrauti und T. Meyer (2017). "A New Method to Individualize Monitoring of Muscle Recovery in Athletes." *Int J Sports Physiol Perform* 12(9): 1137-1142.
- Hecksteden, A., W. Pitsch, F. Rosenberger und T. Meyer (2018). "Repeated testing for the assessment of individual response to exercise training." *J Appl Physiol* (1985) 124(6): 1567-1579.
- Holbrook, T. C., E. K. Birks, M. M. Sleeper und M. Durando (2006). "Endurance exercise is associated with increased plasma cardiac troponin I in horses." *Equine Vet J Suppl*(36): 27-31.
- Horohov, D. W., S. T. Sinatra, R. K. Chopra, S. Jankowitz, A. Betancourt und R. J. Bloomer (2012). "The Effect of Exercise and Nutritional Supplementation on Proinflammatory Cytokine Expression in Young Racehorses During Training." *J Equine Vet Sci* 32(12): 805-815.
- Hövener, J., A. K. Barton, R. Merle und H. Gehlen (2020). "Leistungsinsuffizienz beim Warmblutsporthorse – Ursachen und diagnostische Möglichkeiten: Eine Literaturübersicht. (German)." *Review: Poor performance in the Warmblood sport horse – causes and diagnostic approach. (English) Pferdeheilkunde* 36(6): 511-530.
- Hureau, T. J., R. M. Broxterman, J. C. Weavil, M. T. Lewis, G. Layec und M. Amann (2022). "On the role of skeletal muscle acidosis and inorganic phosphates as determinants of central and peripheral fatigue: A (31) P-MRS study." *J Physiol* 600(13): 3069-3081.
- Julian, R., T. Meyer, H. H. Fullagar, S. Skorski, M. Pfeiffer, M. Kellmann, A. Ferrauti und A. Hecksteden (2017). "Individual Patterns in Blood-Borne Indicators of Fatigue-Trait or Chance." *J Strength Cond Res* 31(3): 608-619.
- Kallus, W. und M. Kellmann (2016). *The Recovery-Stress Questionnaires: User Manual. [RESTQ]*. Pearson.
- Kirsch, K., S. Horstmann, H. Holzhausen, D. Serteyn und C. Sandersen (2020). "Heart rate and blood lactate responses during the cross-country test of 2-star to 5-star eventing competitions." *Comp Exerc Physiol* 16(4): 303-318.
- Kirsch, K. und C. Sandersen (2020). "Traditional and quantitative analysis of acid-base and electrolyte imbalances in horses competing in cross-country competitions at 2-star to 5-star level." *J Vet Intern Med* 34(2): 909-921.

- Kleinnibbelink, G., A. P. van Dijk, A. Fornasiero, G. F. Speretta, C. Johnson, M. T. Hopman, N. Sculthorpe, K. P. George, J. D. Somauroo, D. H. Thijssen und D. L. Oxborough (2021). "Exercise-Induced Cardiac Fatigue after a 45-Minute Bout of High-Intensity Running Exercise Is Not Altered under Hypoxia." *J Am Soc Echocardiogr* 34(5).
- Kowalik, S. und E. Tomaszewska (2018). "Does routine exercise induce stress and in consequence serum amyloid A (SAA) response in purebred Arabian racehorses?" *Pferdeheilkunde* 34(2): 121-125.
- Kristensen, L., R. Buhl, K. Nostell, L. Bak, E. Petersen, M. Lindholm und S. Jacobsen (2014). "Acute exercise does not induce an acute phase response (APR) in Standardbred trotters." *Can J Vet Res* 78(2): 97-102.
- La Gerche, A., A. T. Burns, D. J. Mooney, W. J. Inder, A. J. Taylor, J. Bogaert, A. I. Macisaac, H. Heidbüchel und D. L. Prior (2012). "Exercise-induced right ventricular dysfunction and structural remodelling in endurance athletes." *Eur Heart J* 33(8): 998-1006.
- Legaz-Arrese, A., I. López-Laval, K. George, J. J. Puente-Lanzarote, C. Mayolas-Pi, E. Serrano-Ostáriz, P. Revilla-Martí, D. Moliner-Urdiales und J. Reverter-Masià (2015). "Impact of an endurance training program on exercise-induced cardiac biomarker release." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 308(8): H913-920.
- Lejeune, J. P., C. Sandersen, D. Votion, I. Caudron, L. Vander Heyden, T. Franck, J. Ceusters, A. Mouithys-Mickalad, A. Niesten, G. De La Rebière de Pouyade und D. Serteyn (2010). "Effect of intensive exercise on plasmatic neutrophil elastase level in eventing and endurance horses." *Equine Vet J Suppl*(38): 12-16.
- Liburt, N. R., K. H. McKeever, K. Malinowski, D. N. Smarsh und R. J. Geor (2013). "Response of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to stimulation tests before and after exercise training in old and young Standardbred mares." *J Anim Sci* 91(11): 5208-5219.
- Lippi, G. und F. Sanchis-Gomar (2020). "Cardiac troponins in diagnostics of equine myocardial injury." *J. Lab. Precis. Med.* 5.
- Long, A. und R. Nolen-Walston (2020). "Equine Inflammatory Markers in the Twenty-First Century: A Focus on Serum Amyloid A." *Vet Clin North Am Equine Pract.* 36(1): 147-160.
- Lorello, O., A. Ramseyer, D. Burger, V. Gerber, R. M. Bruckmaier, J. H. van der Kolk und C. Navas de Solis (2017). "Repeated Measurements of Markers of Autonomic Tone Over a Training Season in Eventing Horses." *J Equine Vet Sci* 53: 38-44.
- Mair, J., A. Jaffe, F. Apple und B. Lindahl (2015). "Cardiac Biomarkers." *Dis Markers* 2015: 1-3.

- Malinowski, K., E. J. Shock, P. Rochelle, C. F. Kearns, P. D. Guirnalda und K. H. McKeever (2006). "Plasma beta-endorphin, cortisol and immune responses to acute exercise are altered by age and exercise training in horses." *Equine Vet J Suppl*(36): 267-273.
- Marlin, D. J., P. A. Harris, R. C. Schroter, R. C. Harris, C. A. Roberts, C. M. Scott, C. E. Orme, M. Dunnett, S. J. Dyson und F. Barrelet (1995). "Physiological, metabolic and biochemical responses of horses competing in the speed and endurance phase of a CCI\*\*\*\*3-day-event." *Equine Vet J Suppl*(20): 37-46.
- Masri, M., J. F. Freestone, K. J. Wolfsheimer und K. Shoemaker (1990). "Alterations in plasma volume, plasma constituents, renin activity and aldosterone induced by maximal exercise in the horse." *Equine Vet J Suppl*(9): 72-77.
- McGowan, C. (2008). "Clinical pathology in the racing horse: the role of clinical pathology in assessing fitness and performance in the racehorse." *Vet Clin North Am Equine Pract* 24(2): 405-421, vii.
- McGowan, C. M., L. C. Golland, D. L. Evans, D. R. Hodgson und R. J. Rose (2002). "Effects of prolonged training, overtraining and detraining on skeletal muscle metabolites and enzymes." *Equine Vet J* 34(S34): 257-263.
- McKeever, K. H., K. W. Hinchcliff, S. M. Reed und J. T. Robertson (1993). "Plasma constituents during incremental treadmill exercise in intact and splenectomised horses." *Equine Vet J* 25(3): 233-236.
- McKeever, K. H., K. W. Hinchcliff, S. M. Reed und J. T. Robertson (1993). "Role of decreased plasma volume in hematocrit alterations during incremental treadmill exercise in horses." *Am J Physiol* 265(2 Pt 2): R404-408.
- Meeusen, R., M. Duclos, C. Foster, A. Fry, M. Gleeson, D. Nieman, J. Raglin, G. Rietjens, J. Steinacker, A. Urhausen; European College of Sport Science; American College of Sports Medicine (2013). "Prevention, diagnosis and treatment of the overtraining syndrome: Joint consensus statement of the European College of Sport Science (ECSS) and the American College of Sports Medicine (ACSM)." *Med Sci Sports Exerc.* 2013 Jan;45(1):186-205.
- Meyer, T., A. Ferrauti, M. Kellmann und M. Pfeiffer (2016). Regenerationsmanagement im Spitzensport. In: REGman – Ergebnisse und Handlungsempfehlungen. Sportverl. Strauß.
- Meyer, T., A. Ferrauti, M. Kellmann und M. Pfeiffer (2020). Regenerationsmanagement im Spitzensport Teil 2. In: REGman – Ergebnisse und Handlungsempfehlungen. Sportverl. Strauß.

- Miglio, A., K. Cappelli, S. Capomaccio, S. Mecocci, M. Silvestrelli und M. T. Antognoni (2020). "Metabolic and biomolecular changes induced by incremental long-term training in young thoroughbred racehorses during first workout season." *Animals* 10(2).
- Mihelic, K., Z. Vrbanac, K. Bojanić, T. Kostanjšak, B. B. Ljubić, J. Gotić, D. Vnuk und N. B. Bottegaro (2022). "Changes in Acute Phase Response Biomarkers in Racing Endurance Horses." *Animals (Basel)* 12(21).
- Muñoz, A., C. Riber, R. Santisteban, M. D. Rubio, E. I. Agüera und F. M. Castejón (1999). "Cardiovascular and metabolic adaptations in horses competing in cross-country events." *J Vet Med Sci* 61(1): 13-20.
- Muñoz, A., C. Riber, P. Trigo, C. Castejón-Riber und F. M. Castejón (2010). "Dehydration, electrolyte imbalances and renin-angiotensin-aldosterone-vasopressin axis in successful and unsuccessful endurance horses." *Equine Vet J Suppl*(38): 83-90.
- Munsters, C. C. B. M., B. R. M. Kingma, J. v. d. Broek und M. M. S. v. Oldruitenborgh-Oosterbaan (2020). "A prospective cohort study on the acute:chronic workload ratio in relation to injuries in high level eventing horses: a comprehensive 3-year study." *Prev Vet Med* 179.
- Munsters, C. C. B. M., A. Van Iwaarden, R. Van Weeren und M. M. Sloet Van Oldruitenborgh-Oosterbaan (2014). "Exercise testing in Warmblood sport horses under field conditions." *Vet J* 202(1): 11-19.
- Murray, J. K., E. R. Singer, F. Saxby und N. P. French (2004). "Factors influencing risk of injury to horses falling during eventing." *Vet Rec* 154(7): 207-208.
- O'Brien, P. J., D. E. Smith, T. J. Knechtel, M. A. Marchak, I. Pruijboom-Brees, D. J. Brees, D. P. Spratt, F. J. Archer, P. Butler, A. N. Potter, J. P. Provost, J. Richard, P. A. Snyder und W. J. Reagan (2006). "Cardiac troponin I is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals." *Lab Anim* 40(2): 153-171.
- Oxborough, D., K. Birch, R. Shave und K. George (2010). "Exercise-induced cardiac fatigue- A review of the echocardiographic literature." *Echocardiography* 27.
- Phillips, W., S. Giguère, R. P. Franklin, J. Hernandez, D. Adin und J. G. Peloso (2003). "Cardiac troponin I in pastured and race-training Thoroughbred horses." *J Vet Intern Med* 17(4): 597-599.
- Raeder, C., T. Wiewelhove, M. P. Westphal-Martinez, J. Fernandez-Fernandez, R. A. De Paula Simola, M. Kellmann, T. I. M. Meyer, M. Pfeiffer und A. Ferrauti (2016). "Neuromuscular fatigue and physiological responses after five dynamic squat exercise protocols " *J Strength Cond Res* 30(4): 953-965.



- Rajendren, S. K., N. H. Khairuddin und S. Sugnaseelan (2019). "Concentration of serum amyloid A in clinically normal endurance horses in Malaysia." *Malays J Vet Res (Putrajaya)* 31(1): 28-33.
- Robert, C., A. G. Goachet, A. Fraipont, D. M. Votion, E. Van Erck und J. L. Leclerc (2010). "Hydration and electrolyte balance in horses during an endurance season." *Equine Vet J Suppl(38)*: 98-104.
- Rossi, T. M., P. A. Kavsak, M. G. Maxie, D. L. Pearl, W. G. Pyle und P. W. Physick-Sheard (2018). "Analytical validation of cardiac troponin I assays in horses." *J Vet Diagn Invest* 30(2): 226-232.
- Rossi, T. M., P. A. Kavsak, M. G. Maxie, D. L. Pearl, W. G. Pyle und P. W. Physick-Sheard (2019). "Post-exercise cardiac troponin I release and clearance in normal Standardbred racehorses." *Equine Vet J* 51(1): 97-101.
- Rossi, T. M., P. A. Kavsak, M. G. Maxie, D. L. Pearl, W. G. Pyle und P. W. Physick-Sheard (2021). "Effect of racing on cardiac troponin I concentration and associations with cardiac rhythm disturbances in Standardbred racehorses." *J Vet Cardiol* 35: 14-24.
- Scharhag, J., K. George, R. Shave, A. Urhausen und W. Kindermann (2008). "Exercise-associated increases in cardiac biomarkers." *Med Sci Sports Exerc* 40(8): 1408-1415.
- Schusser, G.F. (2017). *Aktiver Bewegungsapparat - Muskulatur* In: *Handbuch Pferdepraxis*. Stuttgart, Enke Verlag.
- Scott, J. M. und D. E. Warburton (2008). "Mechanisms underpinning exercise-induced changes in left ventricular function." *Med Sci Sports Exerc* 40(8): 1400-1407.
- Siqueira, R. F., R. A. Weigel, G. R. Nunes, C. S. Mori und W. R. Fernandes (2014). "Oxidative profiles of endurance horses racing different distances." *Arq Bras Med Vet Zootec* 66(2): 455-461.
- Siqueira, R. F. d. und W. R. Fernandes (2016). "Post-ride inflammatory markers in endurance horses." *Cienc Rural* 46(7): 1256-1261.
- Stewart, G. M., A. Yamada, L. J. Haseler, J. J. Kavanagh, J. Chan, G. Koerbin, C. Wood und S. Sabapathy (2016). "Influence of exercise intensity and duration on functional and biochemical perturbations in the human heart." *J Physiol* 594(11): 3031-3044.
- Stewart, G. M., A. Yamada, L. J. Haseler, J. J. Kavanagh, G. Koerbin, J. Chan und S. Sabapathy (2015). "Altered ventricular mechanics after 60 min of high-intensity endurance exercise: insights from exercise speckle-tracking echocardiography." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 308(8): H875-883.

- Tjora, S., H. Gjestland, S. Mordal und S. Agewall (2011). "Troponin rise in healthy subjects during exercise test." *Int J Cardiol* 151(3): 375-376.
- Turlo, A., A. Cywińska, M. Czopowicz, L. Witkowski, A. Jaśkiewicz und A. Winnicka (2016). "Racing Induces Changes in the Blood Concentration of Serum Amyloid A in Thoroughbred Racehorses." *J Equine Vet Sci* 36: 15-18.
- Turlo, A., A. Cywinska, M. Czopowicz, L. Witkowski, E. Szarska und A. Winnicka (2015). "Post-exercise dynamics of serum amyloid A blood concentration in thoroughbred horses classified as injured and non-injured after the race." *Res Vet Sci* 100: 223-225.
- Urhausen, A., H. Gabriel und W. Kindermann (1995). "Blood hormones as markers of training stress and overtraining." *Sports Med* 20(4): 251-276.
- Urhausen, A., H. H. Gabriel und W. Kindermann (1998). "Impaired pituitary hormonal response to exhaustive exercise in overtrained endurance athletes." *Med Sci Sports Exerc* 30(3): 407-414.
- Urhausen, A., T. Kullmer und W. Kindermann (1987). "A 7-week follow-up study of the behaviour of testosterone and cortisol during the competition period in rowers." *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 56(5): 528-533.
- Valle, E., R. Zanatta, P. Odetti, N. Traverso, A. Furfaro, D. Bergero, P. Badino, C. Girardi, B. Miniscalco, S. Bergagna, M. Tarantola, L. Intorre und R. Odore (2015). "Effects of competition on acute phase proteins and lymphocyte subpopulations - oxidative stress markers in eventing horses." *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 99(5): 856-863.
- Westerblad, H., J. A. Lee, J. Lännergren und D. G. Allen (1991). "Cellular mechanisms of fatigue in skeletal muscle." *Am J Physiol* 261(2 Pt 1): C195-209.
- Wickler, S. J. und T. P. Anderson (2000). "Hematological changes and athletic performance in horses in response to high altitude (3,800 m)." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279(4): R1176-R1181.
- Wijnberg, I. D. und S. H. Franklin (2017). "The heart remains the core: cardiac causes of poor performance in horses compared to human athletes." *Comp Exerc Physiol* 13(3): 149-174.
- Williams, C. A. (2016). "Horse Species Symposium: The effect of oxidative stress during exercise in the horse1." *J Anim Sci* 94(10): 4067-4075.
- Williams, C. A. und A. O. Burk (2012). "Antioxidant status in elite three-day event horses during competition." *Oxid Med Cell Longev* 2012: 572090.

- 
- Williams, C. A., D. S. Kronfeld, T. M. Hess, K. E. Saker, J. N. Waldron, K. M. Crandell, R. M. Hoffman und P. A. Harris (2004). "Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race." *J Anim Sci* 82(2): 588-594.
- Witkowska-Pilaszewicz, O., P. Bąska, M. Czopowicz, M. Żmigrodzka, J. Szczepaniak, E. Szarska, A. Winnicka und A. Cywińska (2019). "Changes in serum amyloid a (SAA) concentration in Arabian endurance horses during first training season." *Animals* 9(6): 330.
- Witkowska-Pilaszewicz, O., R. Pingwara und A. Winnicka (2020). "The Effect of Physical Training on Peripheral Blood Mononuclear Cell Ex Vivo Proliferation, Differentiation, Activity, and Reactive Oxygen Species Production in Racehorses." *Antioxidants* 9(11): 1155.
- Witkowska-Pilaszewicz, O., M. Żmigrodzka, A. Winnicka, A. Miśkiewicz, K. Strzelec und A. Cywińska (2019). "Serum amyloid A in equine health and disease." *Equine Vet J* 51(3): 293-298.

## IX. Publikationsverzeichnis

### Originalartikel:

Giers, J.; Bartel, A.; Kirsch, K.; Müller, S.F.; Horstmann, S.; Gehlen, H. (2023): Blood-Based Markers for Skeletal and Cardiac Muscle Function in Eventing Horses before and after Cross-Country Rides and How They Are Influenced by Plasma Volume Shift. *Animals* 2023, 13, 3110. <https://doi.org/10.3390/ani13193110>

Giers, J.; Bartel, A.; Kirsch, K.; Müller, S.F.; Horstmann, S.; Gehlen, H. (2024): Blood-based assessment of oxidative stress, inflammation, endocrine and metabolic adaptations in eventing horses accounting for plasma volume shift after exercise, *Veterinary Medicine and Science*, 10, e1409. <https://doi.org/10.1002/vms3.1409>

### **Ergebnisse dieser Dissertation wurden in Form eines Vortrages auf den folgenden Fortbildungsveranstaltungen für Tierärzte vorgestellt:**

Nindorfer Fortbildung für Tierärzte (Datum: 16.06.2023)

Berliner Turniertierärztemeeting (Datum: 15.12.2023)

### **Ergebnisse dieser Dissertation wurden in Form eines Posters auf der folgenden Fortbildungsveranstaltung für Tierärzte vorgestellt:**

DVG Kongress (Datum: 23-25.11.2023)

### **Ergebnisse dieser Dissertation wurden in Form eines Vortrages auf der folgenden Informationsveranstaltungen vorgestellt:**

Task Force Vielseitigkeit – Meeting (Datum: 09.02.2023)

Informationsveranstaltung für ReiterInnen (Datum: 23.03.2023)

## **X. Danksagung**

Meinen aufrichtigen Dank möchte ich Frau Prof. Dr. Heidrun Gehlen aussprechen für ihre unkomplizierte und zielgerichtete Betreuung während des gesamten Projekts.

Ein besonderer Dank gebührt Alexander Bartel für seine wertvolle Unterstützung beim Erstellen der Statistiken sowie für seine Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Den Tierärztinnen des DOKR und Katharina Kirsch danke ich herzlich für ihre umfangreiche Hilfe bei der Planung, beim Sammeln der Proben und für ihre Geduld beim Sortieren meiner Gedanken.

Ein Dank geht auch an meine Kolleginnen Charlotte, Katharina und Insa für ihre Bereitschaft, Diskussionen zu führen, sowie für die unvergesslichen Momente, die wir gemeinsam erlebt haben.

Zudem möchte ich meinen Eltern und Familienangehörigen, FreundInnen und KollegInnen danken, die durch ihre Unterstützung und ihr Verständnis dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit fertig gestellt werden konnte.

## **XI. Finanzierungsquellen**

Die Arbeit wurde finanziell unterstützt durch das Bundesinstitut für Sportwissenschaften (BiSp), ZMVI4-070101\_16-17.

## **XII. Erklärung zu Interessenskonflikten**

Im Rahmen der Datenauswertung wurden die Räumlichkeiten der Deutschen Reiterlichen Vereinigung e.V. und des Deutschen Olympiade Komitee für Reiterei (DOKR) in Warendorf und die dort zur Verfügung stehenden Geräte genutzt. Die Firma LABOKLIN, bei der der Co-Autor beider Veröffentlichungen, Dr. Simon Franz Müller, angestellt ist, stellte Verbrauchsmaterial zur Verfügung.

### **XIII. 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.

Hereby, I declare that I have composed the presented dissertation independently on my own and without any other resources than the ones indicated.

Berlin, den 22.07.2024

Johanna Clara Giers











9 783967 292572

**mbv**berlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-257-2