

3 Material und Methodik

3.1 Tiermaterial, Haltung und Fütterung

Auf 2 Besamungsstationen wurden an 293 Zuchtbullenanwärtern im Alter von 9 bis 20 Monate 480 intravenöse Glukosetoleranztests durchgeführt. Alle Tiere waren klinisch gesund und gehörten der Rasse Holstein-Friesian an (Tab. 1).

Tab.1: Umfang der Untersuchung

<i>Alter</i>	<i>Station 1</i>	<i>Station 2</i>	<i>gesamt</i>
9 – 11 Monate	N=2	N=171	N=173
12–14 Monate	N=113	N=105	N=218
15-20 Monate	N=60*	N=29**	N=89***
Gesamt	N=175 n=138	N=305 n=197	N=480 n=293

N =Anzahl der durchgeführten Tests; n = Anzahl der untersuchten Bullen

42 Bullen wurden sowohl auf Station 1 als auch auf Station 2 getestet, deswegen entspricht die Gesamtzahl der Bullen nicht der Summe der auf Station 1 und 2 getesteten Tiere, sondern ist um 42 kleiner.

** 1x20, 3x19 Monate*

*** keine Tiere: 20 und 19 Monate, 1x18, 3x17 Monate*

****1x20, 3x19 Monate*

Bei den untersuchten Bullen handelte es sich um Aufzucht- und Testbullen. Als Aufzuchtbullen werden Jungbullen bis zu ihrer Körnung am Ende des ersten Lebensjahres bezeichnet. Danach kommen die Tiere in den Testeinsatz und werden bis zum Erreichen einer festgelegten Anzahl von Spermaportionen als Testbullen bezeichnet.

Ursprünglich waren 2 Untersuchungen pro Bulle geplant. Die erste Untersuchung erfolgte auf Station 2 bei 9-11 Monate alten Bullen, die zweite drei Monate später im Alter von 12-14 Monaten. Auf der Station 1 wurden die Tiere erst kurz vor ihrer Körnung eingestallt, so dass sie, von zwei Ausnahmen abgesehen, im Alter von 12-14 Monaten zum ersten Mal getestet werden konnten, der zweite ivGTT erfolgte dann 2 Monate später. Die zweite Untersuchung sollte der Überprüfung der **langfristigen Wiederholbarkeit** dienen. Bei der Festlegung des Zeitabstandes zwischen den beiden Untersuchungen musste u.a. der Einstellungs-

/Umstellungsrythmus der jeweiligen Station berücksichtigt werden. Bei starken Abweichungen der Ergebnisse des ersten Tests, wurde 1-3 Wochen danach eine zweite Untersuchung vorgenommen, um die **kurzfristige Wiederholbarkeit** der abweichenden Ergebnisse zu überprüfen. Einige der Bullen, die auf Station 1 standen, wurden auf der Station 2 aufgezogen und konnten somit auf beiden Stationen getestet werden. Dies war eine gute Möglichkeit, um den **Stationseinfluss** zu beurteilen. Somit wurden einige Tiere statt wie geplant zweimal, dreimal oder manche auch viermal untersucht. Andererseits standen oft schon für die zweite Untersuchung die Bullen nicht mehr zur Verfügung, da sie inzwischen ausgemerzt wurden oder aus anderen Gründen abgegangen sind.

Die Haltung und Fütterung können den Tabellen 2 und 3 entnommen werden. Auf beiden Stationen wurden die Tiere zweimal täglich gefüttert.

Tab.2: Haltung

	<i>Aufzuchtbullen</i>	<i>Testbullen</i>
Station 1 *	Anbindehaltung	Anbindehaltung
Station 2	Gruppen von 6-8 Tieren	Einzelboxen

**Die Tiere kamen kurz vor ihrer Körung auf Station 1 und wurden gleich zusammen mit den Testbullen gehalten*

Tab. 3: Tagesrationen

	<i>Aufzuchtbullen</i>	<i>Testbullen</i>
Station 1 *	14 kg Heu	14 kg Heu
	3 kg Kraftfutter	3 kg Kraftfutter
	200 g Mineralfutter	200 g Mineralfutter
Station 2	Heu ad libitum	Heu und Stroh ad libitum
	2,2 kg Kraftfutter	5,5 kg Kraftfutter
	50 g Mineralfutter	80g Mineralfutter
		10 kg Grassilage

**Die Probanden bekamen sofort die gleiche Ration wie die Testbullen*

3.2 Untersuchungsmethoden

3.2.1 Glukosetoleranztest

Dem Versuch ging eine 12 bis 21-stündige Nüchternphase bei freier Wasseraufnahme voraus. Vor dem Versuch wurden die Bullen gewogen und mit Hilfe eines Strickhalfters am Fressgitter fixiert.

Nach vorheriger Desinfektion wurde eine verschließbare Venenverweilkanüle in die Vena jugularis gelegt. Nachdem die erste Blutprobe zur Bestimmung der Basiswerte entnommen wurde, erfolgte die Verabreichung einer 40%igen Glukoselösung mit einem Masseninjektionsapparat nach Bühner innerhalb von 1-2 Minuten (Dosierung: $1\text{ g} / \text{kg}^{0,75}$). Am Ende der Injektion wurde eine Stoppuhr gestartet und weitere Blutproben nach 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 und 63 Minuten genommen. Bei jeder Probenentnahme wurde das Anfangsaspirat jeweils verworfen.

Am Ende der Untersuchung wurden die geronnenen Blutproben bei 5000U/min 10 min zentrifugiert und das gewonnene Serum bis zur weiteren Verarbeitung bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingelagert.

3.2.2 Rückenfettdickenmessung

Die Messung der Rückenfettdicke erfolgte ultrasonographisch mittels eines tragbaren, batteriebetriebenen Ultraschallgerätes der Firma Alliance Medical Inc[®] entsprechend den Angaben von STAUFENBIEL (1992). Das gerät war mit einem 5,0 MHz Linearscanner ausgestattet. Um einen besseren Kontakt des Schallkopfes mit der Körperoberfläche zu ermöglichen, wurde auf den unrasierten Messpunkt Alkohol aufgetragen (CIMBAL, 1990).

Als optimale Stelle zur Erfassung der Rückenfettdicke hat sich der sakrale Messpunkt bewährt (STAUFENBIEL, 1992). Dieser befindet sich auf der gedachten Verbindungslinie zwischen dem oberen Bereich des Hüfthöckers und dem dorsalen Teil des Sitzbeinhöckers im caudalen Drittel dieser Linie. Dies entspricht in etwa der Höhe des ersten Schwanzwirbels (Abb. 1).

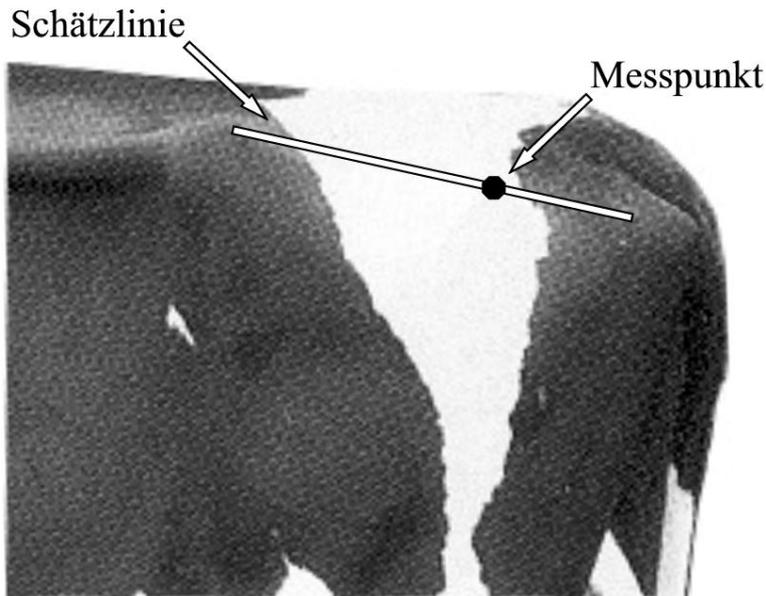


Abb. 1: Der optimale Punkt zur Messung der Rückenfettdicke

3.2.3 Analytische Bestimmungen

3.2.3.1 Glukose

Die Bestimmung der Glukosekonzentration im Serum erfolgte mit Hilfe der Hexokinase-Methode, die auf Arbeiten von SCHMIDT (1961) sowie von PETERSON u. YOUNG (1968) beruht. Die Messung wurde am automatischen Photometer der Firma Hitachi durchgeführt.

3.2.3.2 Insulin

Die Ermittlung der Seruminsulinkonzentration erfolgte mittels des Festphasen-Radioimmunoassay. Dazu wurden die gewonnenen Serumproben zusammen mit ^{125}I -markiertem Insulin in mit spezifischen polyklonalen Insulin-Antikörpern beschichteten Röhrchen pipettiert und 18 – 24 Stunden lang inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Proben dekantiert und damit die nicht gebundenen Reaktionspartner entfernt.

Anschließend wurde die Strahlung des gebundenen ^{125}I -markierten Insulins am Gamma-Counter 1282 Compugamma CS gemessen. Die Berechnung der Insulinkonzentration, die den gemessenen Counts umgekehrt proportional war, erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve. Diese

Kurve wurde vor jeder Messung aus 7 Serumproben mit bekannter Insulinkonzentration erstellt.

3.2.3.3 Auswertung der Ergebnisse

Aus den ermittelten Serumkonzentrationen von Glukose und Insulin wurden folgende Parameter berechnet:

Zur Beurteilung des Glukoseverlaufes dienen die basale Glukosekonzentration (G_0), die maximale Glukosekonzentration über dem Basalspiegel (G_{MAX}), die Glukosehalbwertszeit (G_{HWZ}) sowie das Glukoseflächenäquivalent (G_A) (Abb. 2).

Die Insulinreaktion wurde durch die basale Insulinkonzentration (I_0), die maximale Insulinkonzentration über dem Basalspiegel (I_{MAX}) und das Insulinflächenäquivalent (I_A) beschrieben (Abb. 3).

Zusätzlich wurde ein Quotient aus den beiden Flächenäquivalenten berechnet (I_A/G_A).

Basale Glukose- und Insulinkonzentration (G_0 bzw. I_0)

Die basale Konzentration von Glukose und Insulin wurde im Serum der vor der Glukoseverabreichung gewonnenen Proben gemessen und wird für Glukose in mmol/l und für Insulin in μ U/ml angegeben.

Maximale Glukose- und Insulinkonzentration über dem Basalspiegel (G_{MAX} bzw. I_{MAX})

Die maximale Konzentration über dem Basalspiegel entspricht dem höchsten Glukose- bzw. Insulinwert von den 9 nach der Glukoseverabreichung gewonnenen Proben, abzüglich der basalen Konzentration (G_0 bzw. I_0). Die Einheiten sind ebenso wie bei der Ausgangskonzentration mmol/l für Glukose und μ U/ml für Insulin.

Die maximale Glukosekonzentration ist immer in der ersten Probe nach der Glukoseinfusion gegeben. Die Insulinkonzentration kann im Unterschied dazu noch weiter ansteigen.

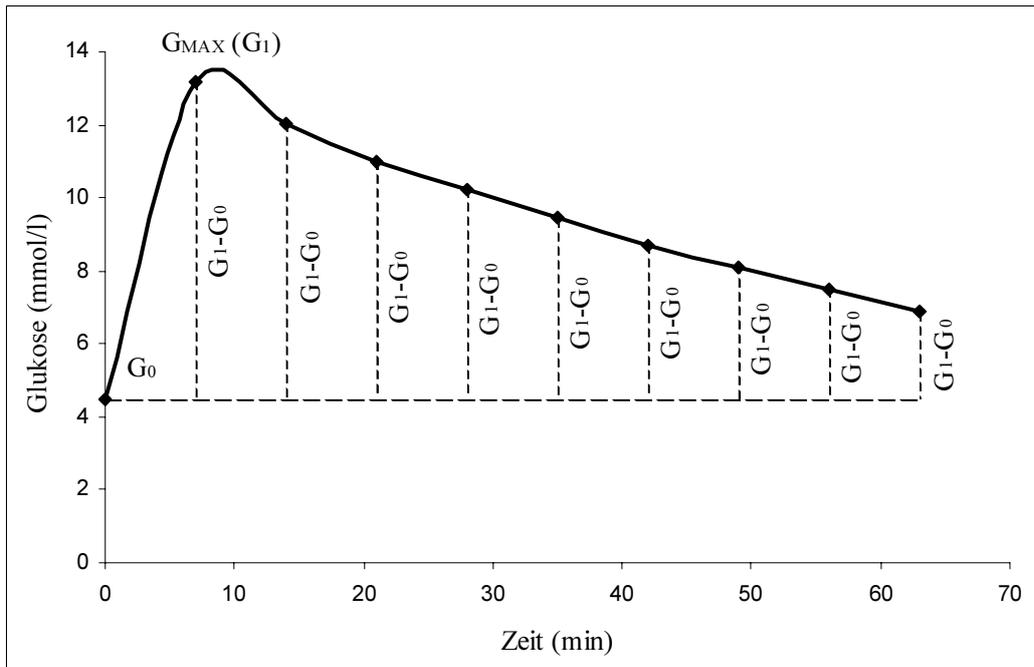


Abb. 2: Parameter der Glukosereaktion im ivGTT: G_0 , G_{MAX} und G_A

G_{MAX} ist immer der erste Wert post infusionem

$$G_A = \sum_{i=1}^9 (G_i - G_0)$$

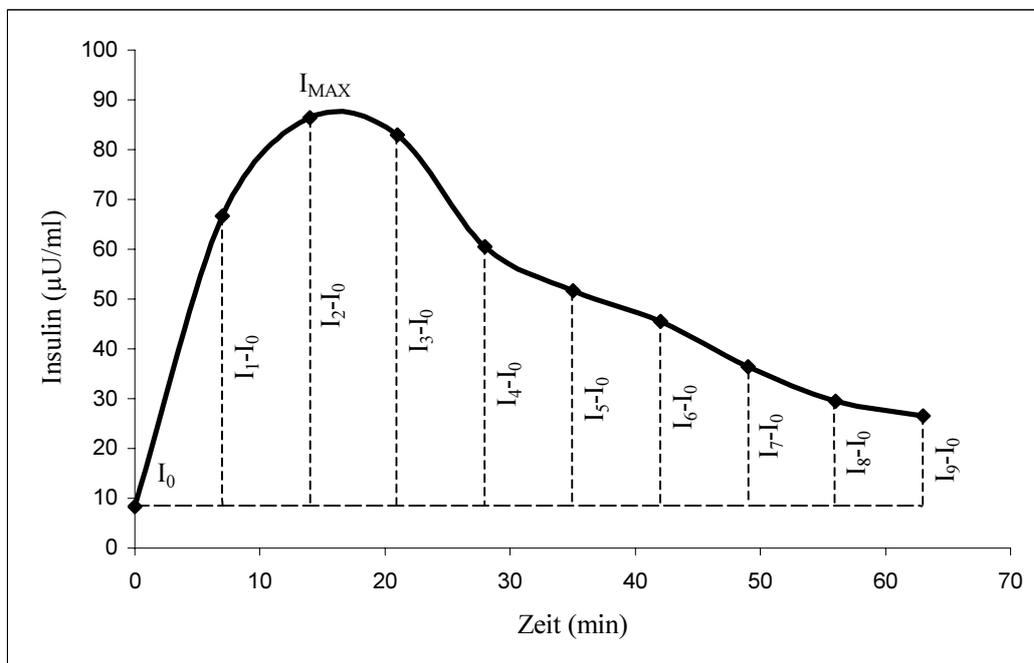


Abb. 3: Parameter der Insulinreaktion im ivGTT: I_0 , I_{MAX} und I_A

I_{MAX} kann auch zu anderen Probeentnahmezeitpunkten erreicht werden

$$I_A = \sum_{i=1}^9 (I_i - I_0)$$

Glukosehalbwertszeit (G_{HWZ})

Die Berechnung der Glukosehalbwertszeit erfolgte aus den ln-transformierten Werten. Dabei wurden nicht alle Messwerte in die Berechnung einbezogen, sondern es ist eine Strecke ausgewählt worden, auf der die einzelnen Messpunkte einen weitgehend linearen Verlauf annehmen.

Die Messstrecke wurde nach zwei verschiedenen Methoden ausgesucht: in einem Fall (**G_{HWZ1}**) war der Zeitabschnitt fest definiert (KANEKO, 1997; BURKERT, 1998). In die Berechnung gingen die Glukosewerte bei 14, 21, 28, 35 und 42 min ein.

Bei der anderen Methode (**G_{HWZ2}**) wurden ebenfalls fünf Messungen in die Berechnung der Glukosehalbwertszeit einbezogen, mit dem Unterschied, dass als erster der Messwert ausgewählt wurde, bei dem die Glukosekonzentration unter 10 mmol/l abgesunken war (REINICKE, 1993). Damit sollte ein Verfälschen der Ergebnisse durch die renale Elimination weitgehend ausgeschlossen werden.

In Anlehnung an die Arbeit von BURKERT (1998) wurde hier die G_{HWZ1} (im Folgenden G_{HWZ}) in die Auswertungen einbezogen.

Die unterschiedlichen Methoden sollten dazu dienen, die Beziehung zwischen den beiden errechneten Glukosehalbwertszeiten zu ermitteln und dadurch die Vergleichbarkeit der einzelnen Literaturangaben zu beurteilen.

Berechnet wurde die Glukosehalbwertszeit nach folgender Formel:

$$G_{HWZ} = -\frac{\ln 2}{k}$$

k kennzeichnet die Steigung, die im Falle der Glukosehalbwertszeit negativ ist. Um am Ende ein positives Ergebnis zu erhalten, wurde vor die Formel ein negatives Vorzeichen gesetzt.

Die Steigung k wurde im Unterschied zu KANEKO (1989) und BURKERT (1998) nicht nur aus dem ersten und dem letzte Messwert ermittelt, sondern sie wurde aus allen fünf Messwerten im festgelegten Zeitabschnitt errechnet und zwar nach der Methode der kleinsten Quadratsumme. Bei dieser Methode wird die Gerade als bestangepasste ausgesucht, bei der die Summe der quadrierten Abstände der einzelnen Messpunkte von der Geraden am kleinsten ist (Abb. 4).

Die Steigung einer solchen Geraden wird mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$k = \frac{\sum [(X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})]}{\sum (X_i - \bar{X})^2}$$

Durch X_i werden hier die einzelnen Probenentnahmezeitpunkte bezeichnet (14, 21, 28, 35 und 42 min.), durch \bar{X} der Mittelwert davon. Y_i steht für die Glukosekonzentrationen zu den jeweiligen Zeitpunkten und \bar{Y} demzufolge für deren Mittelwert.

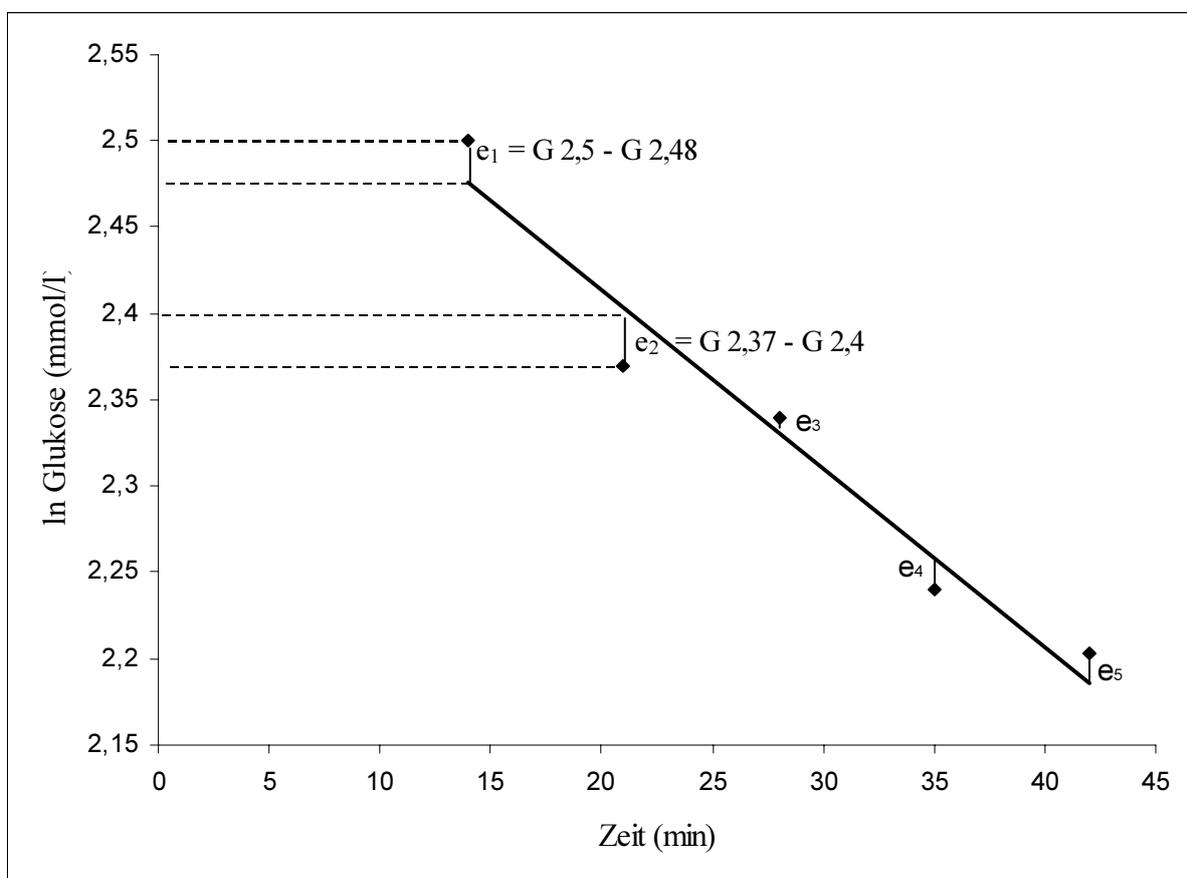


Abb. 4: Methode der kleinsten Quadratsumme. Zur Beschreibung des Punkteverlaufes wird die Gerade als bestgeeignete ausgesucht, deren $\sum e_i^2$ am kleinsten ist

Glukose- und Insulinflächenäquivalente (G_A bzw. I_A)

Ein wichtiger Parameter zur Beschreibung der Glukose- und Insulinreaktion ist die Fläche unter der jeweiligen Kurve. Diese zeigt den benötigten Insulinaufwand zur Wiederherstellung der Glukosehomeostase.

Das Flächenäquivalent ist ein geeignetes Ersatzmaß für die Fläche unter der Konzentrationsverlaufskurve. Die Berechnung erfolgt durch die Addition der Serumkonzentrationen der Proben, die nach der Glukosezufuhr gewonnen wurden, jeweils abzüglich der basalen Konzentration.

Da es sich hierbei um keinen echten Flächeninhalt, sondern nur um ein Ersatzparameter handelt, erfolgt die Angabe der Flächenäquivalente ohne Einheiten.

Quotient aus den Flächenäquivalenten (I_A/G_A)

Einer weiteren Beurteilung der Effektivität der Insulinreaktion dient der Quotient aus der I_A und der G_A .

Hohe Werte sprechen für eine starke Insulinsekretion, eine geringe Insulinelimination sowie eine hohe Gewebeempfindlichkeit gegenüber Insulin und damit eine schnelle Glukoseverwertung. Niedrige Werte treten bei umgekehrten Verhältnissen auf. Ebenso wie bei den Flächenäquivalenten werden auch bei dem Quotient keine Einheiten angegeben.

3.3 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 11.5 für Windows. Die Signifikanzgrenze wurde mit $p \leq 0,05$ festgelegt.

Gesamtüberblick und Prüfung auf Normalverteilung

Von allen Parametern wurden die arithmetischen Mittelwerte, die Standardabweichungen, die minimalen und die maximalen Wert, die 25%-, 50%- (Median) und 75% - Perzentile sowie die Variationskoeffizienten berechnet.

Zur Prüfung auf Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test eingesetzt. Außerdem erfolgte die Beurteilung des Verteilungsmusters visuell durch graphische Darstellung der Einzelwerte. Dafür wurden Boxplots, Stem-and-Leaf-Diagramme, Histogramme sowie Q-Q-Diagramme angewendet.

Um eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen, wurden, in Anlehnung an die Arbeit von BURKERT (1998), unabhängig vom Ergebnis des KS-Tests, für die basale Glukosekonzentration, die maximale Glukosekonzentration und das Glukoseflächenäquivalent, deren Verteilungstyp als weitgehend symmetrisch anzusehen ist, die unten beschriebenen statistischen Methoden angewendet.

Für die Glukosehalbwertszeit, alle Insulinparameter und den Quotient aus den Flächenäquivalenten wurde die Normalverteilungshypothese vom KS-Test abgelehnt, ebenso war auf den Grafiken keine Symmetrie erkennbar. Diese Parameter wurden zur weiteren statistischen Auswertung mit dem natürlichen Logarithmus transformiert. Nach der Logarithmierung wurden die Werte mit Hilfe der oben beschriebenen Methoden erneut auf Normalverteilung getestet, wonach diese nicht mehr abgelehnt werden konnte.

Beurteilung der Beziehungen zwischen den Einflussfaktoren und den Parametern des ivGTT

Die Beziehungen zwischen den einzelnen Einflussfaktoren und den Parametern des Tests wurden graphisch mittels Streudiagramm dargestellt, was eine Betrachtung der Verteilung aller Einzelwerte ermöglicht. Zusätzlich wurde eine Regressionsgerade durch die Punktwolke gelegt sowie der Pearson'sche Korrelationsquotient (r) und die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) berechnet.

Die Gruppenvergleiche sind mittels Boxplots dargestellt. Die Box ist von dem 25%- und dem 75%-Perzentil begrenzt und schließt somit 50% der Werte ein. Die mittlere Linie kennzeichnet den Median. Die horizontalen Linien unter und über der Box stellen den kleinsten bzw. den größten Wert dar, der noch kein Ausreißer und kein Extremwert ist. Als Ausreißer werden die Werte bezeichnet, deren Abstand vom 25%- bzw. dem 75%-Perzentil das 1,5fache bis 3fache der Boxhöhe beträgt. Als Extremwerte werden die Werte definiert, deren Abstand von dem 25%- oder dem 75%-Perzentil das 3fache der Boxhöhe übersteigt. Die Ausreißer sind im Diagramm durch kleine Kreise, die Extremwerte durch Sternchen dargestellt.

Der Vergleich der Mittelwerte von zwei Gruppen erfolgte mit Hilfe des t-Tests bei unabhängigen Stichproben. Bei mehreren Gruppen wurde der Mittelwertsvergleich mittels einfacher Varianzanalyse mit anschließendem multiplen Vergleichstest nach Bonferroni durchgeführt.

Den an die Boxplots angeschlossenen Tabellen ist die beschreibende Statistik für die jeweiligen Gruppen sowie die Signifikanz aus der Varianzanalyse bzw. dem t-Test zu entnehmen.

Zur Beurteilung des Stationseinflusses unter Berücksichtigung der Kovariaten Rückenfettdicke und Körpermasse wurde die kovariante Varianzanalyse durchgeführt.

Pro Bulle wurde bei der Auswertung jeweils nur eine Untersuchung berücksichtigt.

Methodenvergleich bei der Berechnung der Glukosehalbwertszeit

Zur Untersuchung der Beziehung zwischen den beiden Methoden wurden die errechneten Werte einer Regressionsanalyse unterzogen.

Ermittlung des optimalen Probeentnahmezeitpunktes zur Beurteilung der Insulinreaktion

Zur Überprüfung der Beziehung zwischen den einzelnen Insulinparametern wurde der Korrelationsquotient nach Pearson (r) und die Signifikanz (p) berechnet. Um die Verteilung von I_{MAX} auf die Entnahmezeitpunkte zu untersuchen, wurde eine Häufigkeitstabelle erstellt.

Untersuchung der Wiederholbarkeit

Die Ergebnisse der Wiederholungsmessungen wurden gegen die Erstmessung in ein Streudiagramm eingetragen. Es wurden der Pearson'sche Korrelationsquotient (r) und die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) berechnet. Zusätzlich wurde die Differenz zwischen der ersten und der zweiten Untersuchung für jeden einzelnen Bullen berechnet und die Verteilung der Ergebnisse in Form eines Boxplots dargestellt. Der Vergleich der Mittelwerte der beiden Untersuchungen erfolgte mittels eines t-Tests für gepaarte Stichproben. Für die Differenzen wurden die 25%-, 50%- und 75%-Perzentile, der arithmetische Mittelwert (\bar{x}), die Standardabweichung (s) und die Signifikanz (p) unter den jeweiligen Graphiken aufgeführt.