

MAREIKE TAUBE

TRH-Stimulationstests bei mindestens
15 Jahre alten Pferden und Ponys sowie nach
Placebo-kontrollierter Therapie mit Pergolid

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei der Autorin dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autorin oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2025

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publisher.

1st Edition 2025

© 2025 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin,
Klinik für Pferde mit Lehrschmiede, Innere Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. Kerstin Fey

**TRH-Stimulationstests bei mindestens 15 Jahre alten Pferden und Ponys
sowie nach Placebo-kontrollierter Therapie mit Pergolid**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Mareike Taube

Tierärztin aus Henstedt-Ulzburg

Gießen 2024

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

1. Gutachterin: Prof. Dr. Kerstin Fey

2. Gutachterin: Prof. Dr. Daniela Fietz

Tag der Disputation: 11.12.2024

In Liebe und Dankbarkeit
für meine Eltern

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Mareike Taube

In folgenden Fachvorträgen wurden bereits Teile dieser Arbeit präsentiert:

Taube M, Fey K: ACTH responses in aged horses and ponies after 0.5 and 2.0 µg/kg TRH. 5th Global Equine Endocrine Symposium, 3rd to 5th January 2023, Bern

Taube M, Fey K: Vergleich der ACTH Ausschüttungen nach 0,5 und 2,0 µg/kg TRH beim TRH-Stimulationstest des Pferdes. 31. Jahrestagung "Innere Medizin und klinische Labordiagnostik (InnLab)" der DVG, 03.-04. Februar 2023, Göttingen

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
α -MSH	alpha-Melanozyten-stimulierendes Hormon
AUC	Area under the curve
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CLIP	Corticotropin-like intermediate lobe peptide
C-Terminus	Endregion eines Peptids mit freier Carboxylgruppe (-COOH)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Equine Endocrinology Group
gen.	generalisiert
ggr.	geringgradig
G-Protein	GTP (Guaninnukleotid)-bindendes Protein
hgr.	hochgradig
HVL	Hypophysenvorderlappen
I.E.	Internationale Einheit
IL	Interleukin
JLU	Justus-Liebig-Universität
KGW	Körpergewicht
m	männlich
max.	maximal
Max	Maximum
MCR	Melanocortin-Rezeptor
mgr.	mittelgradig
min	Minute
Min	Minimum
mind.	mindestens
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
MW	arithmetischer Mittelwert
n	Anzahl
N-Terminus	Endregion eines Peptids mit freier Aminogruppe (-NH ₂)
PC1	Prohormon-Convertase 1
PC2	Prohormon-Convertase 2
POMC	Proopiomelanocortin
PPID	Pituitary Pars intermedia Dysfunction
reg.	regional
REM	Rapid Eye Movement
SD	Standardabweichung (standard deviation)
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRH	Thyreotropin-Releasing-Hormon, Protirelin, Thyreoliberin
TSH	Thyreoida-stimulierendes Hormon, Thyreotropin
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
w	weiblich

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Zeitlicher Ablauf beider Studienteile	29
Abb. 2:	Links: Biotin H forte (Placebo), rechts: Pergoquin®	31
Abb. 3:	TRH-Stimulationstest mit acht Blutentnahmen (senkrechte blaue Striche) im zeitlichen Verlauf.....	40
Abb. 4:	ACTH-Basalwerte der 18 Probanden nach den beiden TRH-Dosierungen 0,5 µg/kg und 2,0 µg/kg; grau hinterlegt ist der laut Hart et al. (2023) als <i>Interpretive Zone</i> (Dezember bis Juni) im Hinblick auf eine PPID-Diagnose bezeichnete ACTH-Bereich.....	59
Abb. 5:	ACTH-Zehnminutenwerte der 18 Probanden nach den beiden TRH-Dosierungen 0,5 µg/kg und 2,0 µg/kg; grau hinterlegt ist der laut Hart et al. (2023) als <i>Interpretive Zone</i> (Januar bis Juni) im Hinblick auf eine PPID-Diagnose bezeichnete ACTH-Bereich.....	61
Abb. 6:	ACTH-Dreißigminutenwerte der 18 Probanden nach den beiden TRH-Dosierungen 0,5 µg/kg und 2,0 µg/kg; grau hinterlegt ist der laut Hart et al. (2023) als <i>Interpretive Zone</i> (Januar bis Juni) im Hinblick auf eine PPID-Diagnose bezeichnete ACTH-Bereich.....	64
Abb. 7:	Proband 15 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar.....	66
Abb. 8:	Proband 9 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar.....	66
Abb. 9:	Proband 6 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar.....	67
Abb. 10:	Proband 1 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe nach 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar.....	67
Abb. 11:	Proband 11 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar.....	68
Abb. 12:	Proband 5 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar.....	68
Abb. 13:	Proband 14 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar.....	69
Abb. 14:	Proband 16 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar.....	69
Abb. 15:	Proband 12 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar.....	70
Abb. 16:	Proband 3 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar.....	70
Abb. 17:	Proband 18 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar.....	71
Abb. 18:	Proband 10 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar.....	71
Abb. 19:	Proband 13 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar.....	72

Abb. 20:	Proband 8 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar.....	72
Abb. 21:	Proband 7 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar.....	73
Abb. 22:	Proband 4 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar.....	73
Abb. 23:	Proband 17 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar.....	74
Abb. 24:	Proband 2 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar.....	74
Abb. 25:	ACTH-AUCs initial, nach Placebo und nach Therapie (n = 13); Boxplots mit Median, Quartilen sowie als Antennenenden Minimum und Maximum; als Ausreißer (Kreis) werden Werte über dem 1,5-fachen Interquartilsabstand angegeben.....	77
Abb. 26:	ACTH-Basalwerte initial, nach Placebo und nach Therapie (n = 13); Boxplots mit Median, Quartilen sowie als Antennenenden Minimum und Maximum; als Ausreißer (Kreis) werden Werte über dem 1,5-fachen Interquartils- abstand angegeben.....	79
Abb. 27:	ACTH-Basalwerte der 13 Probanden initial, nach Placebo und nach Therapie; grau hinterlegt ist der laut Hart et al. (2023) als <i>Interpretive Zone</i> (Dezember bis Juni) im Hinblick auf eine PPID-Diagnose bezeichnete ACTH-Bereich	80
Abb. 28:	ACTH-Zehnminutenwerte initial, nach Placebo und nach Therapie (n = 13); Boxplots mit Median, Quartilen sowie als Antennenenden Minimum und Maximum; als Ausreißer (Kreis) werden Werte über dem 1,5-fachen Interquartilsabstand angegeben.....	81
Abb. 29:	ACTH-Zehnminutenwerte der 13 Probanden initial, nach Placebo und nach Therapie; grau schraffiert ist der laut Hart et al. (2023) als <i>Interpretive Zone</i> (Januar bis Juni) im Hinblick auf eine PPID-Diagnose bezeichnete ACTH- Bereich.....	82
Abb. 30:	ACTH-Dreißigminutenwerte initial, nach Placebo und nach Therapie (n = 13); Boxplots mit Median, Quartilen sowie als Antennenenden Minimum und Maximum; als Ausreißer (Kreis) werden Werte über dem 1,5-fachen Interquartilsabstand angegeben.....	84
Abb. 31:	ACTH-Dreißigminutenwerte der 13 Probanden initial, nach Placebo und nach Therapie; grau hinterlegt ist der laut Hart et al. (2023) als <i>Interpretive Zone</i> (Januar bis Juni) im Hinblick auf eine PPID-Diagnose bezeichnete ACTH- Bereich.....	85
Abb. 32:	ACTH-Maximalwerte initial, nach Placebo und nach Therapie (n = 13); Boxplots mit Median, Quartilen sowie als Antennenenden Minimum und Maximum; als Ausreißer (Kreis) werden Werte über dem 1,5-fachen Interquartilsabstand angegeben.....	86
Abb. 33:	Proband 1 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten).....	87
Abb. 34:	Proband 16 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten).....	87

Abb. 35: Proband 14 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten).....	88
Abb. 36: Proband 3 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten).....	88
Abb. 37: Proband 8 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten).....	89
Abb. 38: Proband 10 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten).....	89
Abb. 39: Proband 13 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten).....	90
Abb. 40: Proband 12 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten).....	90
Abb. 41: Proband 7 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten).....	91
Abb. 42: Proband 4 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten).....	91
Abb. 43: Proband 2 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten).....	92
Abb. 44: Proband 17 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten).....	92
Abb. 45: Proband 18 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten).....	93

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Tägliche Tablettendosis nach Herstellerangabe (Pergoquin®, WDT, Garbsen)	32
Tab. 2:	Randomisierungsliste für die Reihenfolge der beiden TRH-Dosierungen (µg/kg KGW) beim Dosisvergleich	37
Tab. 3:	Probandenübersicht	49
Tab. 4:	Auffälligkeiten des Haarkleids sowie Fellwechselstörungen der 18 Probanden	52
Tab. 5:	Initiale klinische Scores der 18 Probanden, aufsteigend sortiert anhand ihrer Gesamtscores	54
Tab. 6:	Klinische Scores (Mittelwert ± Standardabweichung) der 13 Probanden der Therapiestudie	55
Tab. 7:	Einteilung der Probanden hinsichtlich ihres PPID-Status, aufsteigend sortiert anhand der ACTH-Zehnminutenwerte nach 2 µg/kg TRH	56
Tab. 8:	Vergleich der ACTH-Dreißigminutenwerte (pg/ml) mit und ohne Proband 2	63
Tab. 9:	ACTH-Maximalwerte (pg/ml) der 18 Probanden	65
Tab. 10:	ACTH-Werte (pg/ml) nach TRH-Tests der 13 Probanden der Therapiestudie	78
Tab. 11:	Insulinkonzentrationen der 18 Probanden	94
Tab. 12:	Interpretation von Insulinkonzentrationen (µU/ml) verschiedener Laborgeräte entsprechend der Empfehlungen der EEG	95
Tab. 13:	UAW-Scores (Mittelwert ± Standardabweichung) nach 0,5 und 2,0 µg/kg TRH; exakter Wilcoxon-Rang-Test für gepaarte Beobachtungen (n = 18)	96
Tab. 14:	UAW-Scores nach den drei TRH-Tests mit 2 µg/kg TRH (Mittelwert ± Standardabweichung); p-Werte mittels Friedman-Test	97
Tab. 15:	Anzahl der 18 Probanden, die innerhalb von 15 min nach TRH auffällige Verhaltensweisen zeigten	98
Tab. 16:	Intraassay-Präzision (pg/ml): Statistik aus einem einzelnen Testansatz mit 20 wiederholten Einzelmessungen von 5 Proben (Herstellerangaben in Testanleitung, Siemens)	156
Tab. 17:	Interassay-Präzision (pg/ml): Statistik aus 8 verschiedenen Testansätzen von 5 Proben (Herstellerangaben in Testanleitung, Siemens)	156
Tab. 18:	Spezifität: Proben mit scheinbaren ACTH-Konzentrationen von 0 pg/ml zeigten eine gewisse Kreuzreaktivität mit zugegebenen ACTH-Fragmenten (1-18, 1-24, 18-39) und Alpha-MSH. Diese Substanzen zeigten eine Bindung an die Antikörper des Tests, was zu einem Anstieg der scheinbaren ACTH-Konzentration in der Probe führte	157
Tab. 19:	Interferenzen: Einfluss möglicher Probeninhaltsstoffe auf Messergebnisse	157
Tab. 20:	Spezifität: Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität des ADVIA Centaur® Insulin-Tests wurden Serumproben folgende Substanzen in angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Die Substanzen hatten keinen signifikanten Effekt auf die Insulinmessung	158
Tab. 21:	Präzision: 3 baugleiche ADVIA Centaur® Systeme, die Anzahl der zur Berechnung der Präzision herangezogenen Einzelmessungen beträgt n = 72	

für jede Probe, über einen Zeitraum von 4 Tagen, mit folgenden Ergebnissen:

.....	158
Tab. 22: Interferenzen: Einfluss in angegebener Menge zugesetzter Probenbestandteile auf Insulinwerte.....	158
Tab. 23: Klinisch auffällige Befunde in den Voruntersuchungen	160
Tab. 24: Laborparameter, die im Rahmen der Voruntersuchungen bestimmt wurden	161
Tab. 25: Enzymaktivitäten und Gallensäuren der Probanden 13 und 14; obere Grenzwerte in Klammern angegeben	162
Tab. 26: Klinische Auffälligkeiten, die über die Befunde, die bei den Voruntersuchungen erhoben wurden, hinaus gingen bzw. davon abwichen	163
Tab. 27: UAW-Scores (n = 18) nach 2 µg/kg TRH (Mittelwert ± Standardabweichung)	165
Tab. 28: UAW-Scores (n = 18) nach 0,5 µg/kg TRH (Mittelwert ± Standardabweichung)	165

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	DYSFUNKTION DES HYPOPHYSÄREN ZWISCHENLAPPENS BEIM PFERD – Kenntnisstand August 2024	3
2.2	PATHOPHYSIOLOGIE DER PPID	4
2.2.1	Degeneration dopaminergener Nervenzellen.....	4
2.2.2	POMC-Produkte der Pars intermedia und ihre Wirkungen	8
2.2.2.1	Adrenocorticotropes Hormon (ACTH).....	9
2.2.2.2	Alpha-Melanozyten stimulierendes Hormon (α -MSH)	12
2.2.2.3	Corticotropin-like intermediate lobe peptide (CLIP) und β -Zelltropin.....	16
2.2.2.4	β -Lipotropin und β -Endorphin.....	17
2.3	TRH-STIMULATIONSTEST BEI PPID	18
2.3.1	Wirkprinzip des TRHs.....	19
2.3.2	Testprinzip und Vorbereitung des TRH-Stimulationstests	20
2.3.3	Grenzwerte nach TRH-Stimulationstest	21
2.3.4	Arzneimittelrechtliche Aspekte	23
2.4	PERGOLID BEI PPID	23
2.4.1	Wirkprinzip des Pergolids.....	23
2.4.2	Effekte des Pergolids beim Pferd	24
2.4.3	Pharmakokinetik und -dynamik.....	25
2.4.4	Unerwünschte Wirkungen.....	26
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	28
3.1	MATERIAL UND METHODEN	28
3.1.1	Studiendesign	28
3.1.1.1	TRH-Dosisvergleich	30
3.1.1.2	Therapiestudie.....	30
3.1.2	Probanden	32
3.1.2.1	Biometrische Planung.....	32
3.1.2.2	Besitzeraufklärung.....	33
3.1.2.3	Ein- und Ausschlusskriterien	33
3.1.3	Tierversuchsgenehmigung.....	34
3.1.4	Voruntersuchungen.....	34
3.1.5	Klinische Untersuchungen und Scores	35
3.1.6	TRH-Stimulationstest.....	36
3.1.6.1	Legen des Venenverweilkatheters	37
3.1.6.2	Basale Blutprobenentnahme.....	38
3.1.6.3	TRH-Injektion und weiterer Ablauf	38
3.1.6.4	Blutprobenaufbereitung.....	41
3.1.6.5	Unerwünschte TRH-Wirkungen.....	41
3.1.7	Laboruntersuchungen	42

3.1.7.1	ACTH	42
3.1.7.2	Insulin	43
3.1.8	Statistische Auswertungen	44
3.1.8.1	Statistik zum klinischen Score	45
3.1.8.2	Statistik zum TRH-Dosisvergleich	45
3.1.8.3	Statistik zur Therapiestudie	46
3.1.8.4	Statistik zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen nach TRH	46
3.2	ERGEBNISSE	48
3.2.1	Probandenübersicht	48
3.2.1.1	Voruntersuchungen	49
3.2.1.1.1	Vorbericht	50
3.2.1.1.2	Klinische Voruntersuchungen	53
3.2.1.1.3	Labordiagnostische Voruntersuchungen	53
3.2.1.2	Klinische Untersuchungen und Scores an den Testtagen	53
3.2.1.3	Einteilung der Probanden hinsichtlich ihres PPID-Status	55
3.2.2	TRH-Dosisvergleich	57
3.2.2.1	ACTH-AUCs	58
3.2.2.2	ACTH-Basalwerte	58
3.2.2.3	ACTH-Zehnminutenwerte	60
3.2.2.4	ACTH-Dreißigminutenwerte	62
3.2.2.5	ACTH-Maximalwerte und Zeitpunkt ihres Auftretens	65
3.2.2.6	Intraindividuelle ACTH-Verläufe	65
3.2.3	Therapiestudie	76
3.2.3.1	ACTH-AUCs	76
3.2.3.2	Übersicht ACTH-Werte	77
3.2.3.2.1	ACTH-Basalwerte	78
3.2.3.2.2	ACTH-Zehnminutenwerte	81
3.2.3.2.3	ACTH-Dreißigminutenwerte	84
3.2.3.2.4	ACTH-Maximalwerte und Zeitpunkt ihres Auftretens	85
3.2.3.2.5	Intraindividuelle ACTH-Verläufe	86
3.2.4	Basales Insulin	93
3.2.5	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen	96
3.2.5.1	TRH	96
3.2.5.2	Placebo-Phase	98
3.2.5.3	Pergolid-Phase	98
4	DISKUSSION	100
4.1	DISKUSSION DER METHODIK VON STUDIENTEIL 1: TRH-DOSISVERGLEICH. 100	
4.1.1	Diskussion des Studiendesigns des TRH-Dosisvergleichs	100
4.1.2	Begründung für die Ein- und Ausschlusskriterien des TRH-Dosisvergleichs 102	
4.2	DISKUSSION DER METHODIK VON STUDIENTEIL 2: THERAPIESTUDIE	104

4.2.1	Diskussion des Studiendesigns der Therapiestudie	104
4.2.1.1	Diskussion der gewählten Therapiedauer	105
4.2.1.2	Diskussion der gewählten Tabletten	106
4.2.2	Begründung für die Ein- und Ausschlusskriterien der Therapiestudie.....	108
4.3	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	110
4.3.1	Diskussion der Studiendurchführung	110
4.3.2	Diskussion der Probandenauswahl	112
4.3.2.1	Diskussion des Signalements	112
4.3.2.2	Diskussion der Vorerkrankungen	113
4.3.2.3	Diskussion der labordiagnostischen Voruntersuchungen.....	114
4.3.2.4	Diskussion der klinischen Untersuchungsergebnisse.....	114
4.3.2.5	Diskussion des PPID-Status der Probanden bei Studieneinschluss..	116
4.3.3	Diskussion der ACTH-Werte im TRH-Dosisvergleich	117
4.3.3.1	Diskussion der ACTH-Verläufe im TRH-Dosisvergleich.....	117
4.3.3.2	Diskussion der ACTH-Basalwerte im TRH-Dosisvergleich	118
4.3.3.3	Diskussion der ACTH-Zehnminutenwerte im TRH-Dosisvergleich ...	120
4.3.3.4	Diskussion der ACTH-Dreißigminutenwerte im TRH-Dosisvergleich	122
4.3.3.5	Diskussion der ACTH-Maximalwerte im TRH-Dosisvergleich	123
4.3.4	Diskussion der ACTH-Werte in der Therapiestudie	124
4.3.4.1	Diskussion der ACTH-Verläufe in der Therapiestudie	126
4.3.4.2	Diskussion der ACTH-Basalwerte in der Therapiestudie	130
4.3.4.3	Diskussion der ACTH-Zehnminutenwerte in der Therapiestudie.....	132
4.3.4.4	Diskussion der ACTH-Dreißigminutenwerte in der Therapiestudie.	134
4.3.4.5	Diskussion der ACTH-Maximalwerte in der Therapiestudie	135
4.3.5	Diskussion der basalen Insulinwerte	136
4.3.6	Diskussion unerwünschter Arzneimittelwirkungen (UAW).....	138
4.3.6.1	Diskussion der UAW vom TRH	138
4.3.6.2	Diskussion der UAW von Pergolid	141
5	SCHLUSSFOLGERUNGEN	144
6	ZUSAMMENFASSUNG	145
7	SUMMARY	147
8	ANHANG	149
8.1	KLINISCHES SCORE-SYSTEM	149
8.2	KENNZAHLEN ANALYSEGERÄTE	156
8.2.1	Immulite® 2000 XPi ACTH.....	156
8.2.2	ADVIA Centaur® XP Insulin	158
8.3	WEITERE ERGEBNISSE.....	159
8.3.1	Klinische Voruntersuchungen.....	159
8.3.2	Labordiagnostische Voruntersuchungen	161
8.3.3	Klinische Untersuchungen an den Testtagen	163
8.3.4	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen des TRHs.....	165
9	LITERATURVERZEICHNIS	166

1 EINLEITUNG

Die Pituitary Pars intermedia Dysfunction (PPID) stellt mit einer Prävalenz von 21,2 % eine der häufigsten endokrinologischen Erkrankungen bei Pferden und Ponys ab einem Alter von 15 Jahren dar (Ireland und McGowan 2018). Sie führt durch eine krankhafte Vergrößerung und Aktivität des Zwischenlappens (Pars intermedia) der Hirnanhangsdrüse (Hypophyse) zu einem hormonellen Ungleichgewicht. Neben der erst im fortgeschrittenen Krankheitsstadium auftretenden pathognomonischen Hypertrichose können erkrankte Pferde eine Vielzahl unspezifischer Symptome aufweisen (Steel et al. 2022). Die routinemäßige Diagnose erfolgt durch Messung der basalen Konzentration des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH) im Blut, welche aber erst bei fortgeschrittener PPID regelmäßig erhöht ist. Bei uneindeutigen Fällen wird die Anwendung des Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH)-Stimulationstests empfohlen (Hart et al. 2023). Hierbei wird die ACTH-Ausschüttung nach einer einmaligen intravenösen Injektion des Stimulans TRH nach 10 und/oder 30 Minuten gemessen. Die üblicherweise verwendete TRH-Dosis liegt bei 1 mg pro Pferd mit einem Körpergewicht (KGW) über 250 kg. Da diese Dosierung nicht wissenschaftlich überprüft zu sein scheint, führte die eigene Arbeitsgruppe bereits Untersuchungen von körpergewichtsbezogenen Dosierungen durch. Es wurden die ACTH-Konzentrationen nach 2 µg/kg (abgeleitet von der Empfehlung 1 mg TRH pro Pferd mit einem Gewicht von 500 kg zu verwenden) und 1 µg/kg TRH sowohl bei gesunden als auch erkrankten Pferden verglichen und kein statistisch signifikanter Unterschied in der ACTH-Freisetzung gefunden (Schorn 2019, Stallenberger 2020). Primäres Ziel dieser Dissertation war es nun zu überprüfen, ob eine weitere TRH-Dosisreduktion auf 0,5 µg/kg zu einer verminderten ACTH-Ausschüttung im Vergleich zur üblichen Dosis von 2 µg/kg bei mindestens 15 Jahre alten Pferden führt.

Die symptomatische, zugelassene Therapie der PPID erfolgt mit der täglichen Gabe des Dopamin-Agonisten Pergolid. Die Studienlage zum Einfluss einer mehrwöchigen Pergolidtherapie auf die Ergebnisse im TRH-Stimulationstest ist bisher begrenzt, weshalb in einem zweiten Schritt untersucht werden sollte, wie sich die Ergebnisse der Pferde mit initial auffälligen Ergebnissen im TRH-Stimulationstest nach vier- bis

EINLEITUNG

sechswöchiger Pergolidtherapie im Vergleich zu einer vorangegangenen Placebogabe veränderten.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit bestanden demnach in der Untersuchung folgender Fragestellungen:

1. Führt die Gabe von 0,5 µg/kg TRH im Vergleich zu 2 µg/kg TRH zu niedrigeren ACTH-Ausschüttungen bei mindestens 15 Jahre alten Pferden?
2. Gibt es einen Unterschied zwischen den ACTH-Ausschüttungen nach 2 µg/kg TRH vor und nach vier- bis sechswöchiger Gabe eines Placebos bzw. von Pergolid?

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 DYSFUNKTION DES HYPOPHYSÄREN ZWISCHENLAPPENS BEIM PFERD – KENNTNISSTAND AUGUST 2024

Die Pituitary Pars intermedia Dysfunktion (PPID) stellt eine der wichtigsten endokrinologischen Erkrankungen bei älteren Pferden und Ponys dar und betrifft ca. 3 % (Welsh et al. 2016) der gesamten Pferdepopulation. In den letzten zwanzig Jahren gewann die Krankheit aufgrund zunehmenden Interesses von Seiten der Pferdepraktiker und -besitzer sowie aufgrund einer wachsenden Studienlage stark an Bedeutung. Die Prävalenz bei Pferden und Ponys ab 15 Jahren liegt bei ca. 21 % und steigt mit zunehmendem Alter weiter an (McGowan et al. 2013).

Wie der Name „PPID“ erkennen lässt, kommt es bei der Erkrankung zu Veränderungen des hypophysären Zwischenlappens (Pars intermedia). Die dort lokalisierten melanotropen Zellen produzieren und sezernieren krankhaft verstärkt ihre Hormone, was als Dysfunktion bezeichnet wird. Im Genaueren handelt es sich um eine Hyperplasie bis hin zur Adenombildung (McFarlane 2007). Sie entsteht, da aus dem Hypothalamus stammende dopaminerge Nervenzellen degenerieren (Kap. 2.2.1) und somit ihr hemmender Effekt auf die Pars intermedia ausbleibt (McFarlane et al. 2005). Daraus resultiert eine Überaktivität der melanotropen Zellen mit vermehrter Produktion des Prohormons Proopiomelanocortin (POMC) und seiner Spaltprodukte (Kap. 2.2.2). Das für die Diagnostik wichtigste POMC-Spaltprodukt stellt das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) dar. Es ist bei PPID vermehrt nachweisbar, aber an der Nebennierenrinde biologisch inaktiv (Carmalt et al. 2018), da es nicht zu einer erhöhten Cortisolausschüttung führt (Cordero et al. 2011). Somit ist der früher für das Krankheitsbild verwendete Begriff „Equines Cushing Syndrom“ nicht korrekt und sollte nicht mehr verwendet werden.

Da in den Dissertationen der eigenen Arbeitsgruppe (Schorn 2019, Stallenberger 2020) sowie in den alle zwei Jahre aktualisierten „Recommendations for the Diagnosis and Management of Pituitary Pars Intermedia Dysfunction“ der Equine Endocrinology Group (<https://equineendocrinologygroup.org/>, letzter Zugriff September 2024) die klinische

LITERATURÜBERSICHT

und labordiagnostische Diagnostik sowie Therapie der PPID bereits umfassend erläutert bzw. laufend aktualisiert wurden, wird im Folgenden auf diese Bereiche nur im Hinblick auf die eigenen Fragestellungen detaillierter eingegangen.

2.2 PATHOPHYSIOLOGIE DER PPID

2.2.1 Degeneration dopaminerger Nervenzellen

Die Pars intermedia der Hypophyse enthält im Gegensatz zur Pars distalis ausschließlich einen hormonproduzierenden Zelltyp, die melanotropen Zellen. Diese produzieren Proopiomelanocortin (POMC), ein Vorläuferhormon, aus dem zahlreiche weitere kleine Peptide entstehen, die unterschiedliche hormonelle Wirkungen entfalten. Bei gesunden Pferden und Ponys wird die POMC-Synthese im Zwischenlappen durch den Neurotransmitter Dopamin kontrolliert und gehemmt. Das Dopamin stammt aus periventriculären Neuronen des Hypothalamus, deren Nervenendigungen in der Pars intermedia liegen. Der dort freigesetzte Neurotransmitter bindet an Dopamin-D2-Rezeptoren der melanotropen Zellen (Saland 2001).

Bei an PPID erkrankten Pferden und Ponys hingegen führt eine spontan auftretende, progressive Degeneration dieser Nervenzellen zu einem Wegfall der hemmenden Dopamin-Wirkung. Daraus resultiert eine Vergrößerung des Zwischenlappens und eine unkontrollierte Produktion sowie Freisetzung hormonell wirksamer POMC-Spaltprodukte aus den melanotropen Zellen. Die These, dass der zugrundeliegende Pathomechanismus auf einem Dopaminmangel beruht, wurde in der Vergangenheit durch mehrere Studien bestätigt. Zum einen wurde nachgewiesen, dass bei 10 an PPID erkrankten Pferden die Dopamin-Konzentration in der Pars intermedia im Vergleich zu 18 gesunden, gleichaltrigen Pferden um über 88 % herabgesetzt war (Millington et al. 1988). Zum anderen wurde gezeigt, dass die Aktivität der Tyrosin-Hydroxylase - das Enzym, welches die Geschwindigkeit der Dopamin-Synthese bestimmt - in den dopaminergen Nervenzellen der an PPID erkrankten Pferde im Vergleich zu Gesunden um 80 % herabgesetzt war (McFarlane et al. 2005). Ergänzend wurde der positive Therapieeffekt von Dopamin und Dopamin-Agonisten in Bezug auf eine reduzierte

LITERATURÜBERSICHT

Ausschüttung von POMC-Spaltprodukten erstmalig bereits 1982 dokumentiert (Orth et al. 1982). Zahlreiche Studien zeigten seither, dass die Substitution von Dopamin-Agonisten das klinische Bild und die labordiagnostischen Parameter verbessert (Beech 1994, Fey et al. 1998, Donaldson et al. 2002, Andrews et al. 2011, McFarlane et al. 2017, Rendle et al. 2019).

Es wird davon ausgegangen, dass die Degeneration der periventriculären, dopaminergen Nervenzellen bei PPID infolge von chronischem, oxidativem Stress entsteht. Oxidativer Stress entwickelt sich im Gewebe durch freie Sauerstoffradikale, die zu einer Schädigung von zellulären Bestandteilen und zum Zelltod führen (McFarlane et al. 2005). Faktoren, die oxidativen Stress begünstigen, sind zum einen eine erhöhte Exposition gegenüber freien Sauerstoffradikalen und zum anderen eine herabgesetzte antioxidative Kapazität im Gewebe. Antioxidative Mechanismen sind insbesondere bei mitochondrialer Dysfunktion, abnormen systemischen Stoffwechselforgängen oder chronischen Entzündungen herabgesetzt (McFarlane und Cribb 2005).

Labordiagnostisch gibt es die Möglichkeit spezielle Biomarker im Gewebe zu messen, um oxidativen Stress nachzuweisen. In der Studie von McFarlane et al. (2005) wurde 3-Nitrotyrosin als oxidativer Stressmarker bei PPID untersucht. Es entsteht im Organismus, wenn sich die reaktive Sauerstoff- bzw. Stickstoffverbindung Peroxynitrit mit der Aminosäure Tyrosin verbindet und diese nitriert. Die Autoren fanden beim Vergleich von gesunden Pferden unterschiedlichen Alters (zwölf Pferde ≤ 15 Jahre und zwölf Pferde > 15 Jahre) heraus, dass es eine mit zunehmendem Alter positiv korrelierte Akkumulation des Biomarkers (6-facher Anstieg, $p < 0,05$) in den dopaminergen Nervenendigungen der Pars intermedia gibt. Zudem konnte beim Vergleich von alten, gesunden ($n = 12$) mit alten, an PPID erkrankten Pferden ($n = 12$) gezeigt werden, dass Letztere im Gewebe der Pars intermedia signifikant mehr ($p < 0,001$) 3-Nitrotyrosin aufwiesen. In der Immunhistochemie lag der Anteil an 3-Nitrotyrosin positiv gefärbten Feldern mit 48 ± 6 % bei den an PPID erkrankten mehr als doppelt so hoch wie bei den gleichaltrigen Kontrollpferden (20 ± 7 %).

Weiterhin untersuchten McFarlane und Cribb (2005), ob es Hinweise auf systemischen oxidativen Stress bei PPID gibt. Sie verglichen das Vorkommen und die Konzentration

LITERATURÜBERSICHT

von 3-Nitrotyrosin sowie die Aktivitäten von antioxidativen Stoffen (Glutathionperoxidase, Superoxiddismutase, Glutathion) in Plasma, Nebenniere und Substantia nigra bei an PPID erkrankten ($n = 20$) und gesunden ($n = 20$) Pferden. In den Probenmaterialien konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, was darauf hinweist, dass die PPID nicht aus systemischem, sondern lokalem oxidativem Stress resultiert. Die These wird zudem dadurch unterstützt, dass es im Gewebe der Pars intermedia von 16 weiteren euthanasierten Pferden sowohl zu einem signifikanten Anstieg der Glutathionperoxidase-Aktivität als auch der 3-Nitrotyrosin-Konzentration kam, so dass diese beiden Parameter zudem signifikant korrelierten ($r = 0,51$; $p = 0,04$). Auch Zak et al. (2020) verglichen die Konzentrationen von antioxidativen Stressmarkern und Enzymsystemen in equinen Serum- und Plasmaproben bei insgesamt 32 Pferden, die in drei Gruppen (7 junge Adulte, 6 alte Adulte und 19 PPID-krankte Pferde) eingeteilt wurden. Auch diese Autoren fanden keine signifikanten Unterschiede des antioxidativen Status im Blut zwischen den an PPID erkrankten Pferden im Vergleich mit den anderen Gruppen.

Einen weiteren Marker für oxidativen Stress stellt Lipofuszin dar. Dies ist ein endogenes Alterspigment, das infolge von Schäden durch freie Radikale, Lipidperoxidation und ausfallende Autophagie entsteht. Glover et al. (2009) verglichen die Hypophysen von 32 an PPID erkrankten und 20 gesunden Pferden pathohistologisch und beschrieben eine signifikant erhöhte Ansammlung von Lipofuszin im Gewebe der Hirnanhangsdrüsen der Erkrankten. Der Farbstoff wurde vorrangig in zwei Bereichen gefunden: Zum einen in dem Teil der Pars nervosa, der direkt an die Pars intermedia grenzt und des Weiteren in der Pars intermedia in bindegewebigen Septen zwischen den melanotropen Zellen. Die vermehrte Lipofuszinanreicherung bei an PPID erkrankten Pferden weist auf ein lokal erhöhtes oxidatives Stresslevel hin.

Zudem wird ein Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der Überexpression von α -Synuclein gesehen. Dies ist ein kleines, lösliches Protein, dass in präsynaptischen Nervenendigungen von dopaminergen Neuronen exprimiert wird. McFarlane et al. (2005) konnten zeigen, dass erkrankte Pferde ($n = 12$) im Vergleich zu Gesunden ($n = 24$) eine höhere Bildung von α -Synuclein in der Pars intermedia im Verhältnis zur Pars

LITERATURÜBERSICHT

distalis aufweisen (Verhältnis: $1,54 \pm 0,08$ versus $0,91 \pm 0,04$, $p < 0,001$). In der Studie wurde bei nicht an PPID erkrankten, alten Pferden eine erhöhte Expression an 3-Nitrotyrosin und α -Synuclein in der Pars intermedia bei gleichzeitig normalen Tyrosinhydroxylase-Konzentrationen festgestellt. Daraus folgerten die Autoren, dass oxidativer Stress und die Überexpression von α -Synuclein wahrscheinlich ursächlich für die PPID sind, und sie nicht erst als Folgen von Neurodegeneration interpretiert werden sollten.

Aus humanmedizinischen Studien ist bekannt, dass das α -Synuclein nitriert werden kann. Diese Modifikation des α -Synucleins lässt ein nicht lösliches Protein entstehen, welches in den Neuronen akkumuliert. Bei der Parkinson-Erkrankung des Menschen stellt diese Akkumulation einen Hauptbestandteil der sogenannten Lewy-Körperchen (Einschlusskörperchen) dar (Giasson et al. 2000, Danielson et al. 2009). McFarlane et al. (2005) zeigten eine Kolo-kalisation von 3-Nitrotyrosin und α -Synuclein im Gewebe der equinen Pars intermedia bei Pferden mit und ohne PPID. Daher schlussfolgerten sie, dass es auch bei der PPID einen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der Akkumulation von α -Synuclein gibt.

In einer neueren Studie wurde gezeigt, dass das α -Synuclein von fünf an PPID erkrankten Pferden fehlgefaltet war und die Neigung aufwies zu aggregieren (Fortin et al. 2021). Die Autoren entdeckten, dass das Protein bei den erkrankten Tieren *in vitro* fibrilläre Strukturen ausprägt. Die weiteren Untersuchungen des α -Synucleins ergaben, dass insbesondere die Region mit den Aminosäuren 62-86 - ebenso wie beim humanen α -Synuclein - die höchste Neigung aufwies zu aggregieren. Bisher ist allerdings noch nicht sicher geklärt, ob das fehlgefaltete α -Synuclein ein Auslöser oder eine Konsequenz der dopaminergen Neurodegeneration ist.

Ob es beim Pferd neben Dopamin weitere physiologisch regulierende, neurochemische Substanzen gibt, die die melanotropen Zellen der Pars intermedia beeinflussen, ist nach Kenntnis der Autorin bislang (2024) nicht nachgewiesen. Da bei Amphibien herausgefunden wurde, dass Gamma-Aminobuttersäure (GABA) und der Wachstumsfaktor Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) regulatorische Effekte auf

LITERATURÜBERSICHT

die Pars intermedia besitzen (Verburg-van Kemenade et al. 1986, Jenks et al. 2012), sind ähnliche Mechanismen auch beim Pferd vorstellbar.

2.2.2 POMC-Produkte der Pars intermedia und ihre Wirkungen

Bei der PPID kommt es durch den Wegfall der dopaminergen Kontrolle der Pars intermedia in den melanotropen Zellen zu einer verstärkten Synthese von Proopiomelanocortin (POMC). Durch multiple Spaltungen und post-transkriptionelle Modifikationen entstehen aus dem Polypeptid POMC verschiedene, zum Teil hormonell wirksame Polypeptidfragmente. Die Spaltungen werden vorrangig durch die Enzyme Prohormon-Convertase 1 und 2 (PC1 und PC2) katalysiert. Einen weiteren Einfluss haben die Enzyme N-Acetyltransferase und Carboxypeptidase E. Zu den am häufigsten untersuchten Produkten zählen das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) und das alpha-Melanozyten-stimulierende Hormon (α -MSH), aber auch das Corticotropin-like intermediate lobe peptide (CLIP), β -Lipotropin und β -Endorphin (siehe Übersicht im Lehrbuch „Equine Endocrinology“ im Kapitel „Diseases of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis“, Bertin und Fraser 2020).

Die vermehrte Expression und Sekretion der vom POMC abgeleiteten Peptidhormone kann zu einem über 40-fachen Konzentrationsanstieg dieser Produkte führen, der sich sowohl im Blut als auch im Gewebe der Pars intermedia nachweisen lässt (Orth et al. 1982). Während die Plasmakonzentrationen von ACTH und α -MSH signifikant höhere Werte bei PPID im Vergleich zu Kontrollpferden aufweisen, unterscheiden sich die POMC-Konzentrationen im Blut nicht (Carmalt et al. 2018).

Auch wenn die Studienlage hinsichtlich der pathophysiologischen Wirkungen der POMC-Produkte begrenzt ist, geht man davon aus, dass die erhöhte Konzentration der Spaltprodukte einen Großteil der klinischen Symptome erklärt (McFarlane 2007). Diese These wird dadurch unterstützt, dass gezeigt wurde, dass bei Pferden mit Hirsutismus die Anzahl der anamnestischen und klinischen Symptome mit dem natürlichen Logarithmus von α -MSH ($r = 0,63$, $p < 0,001$) und ACTH ($r = 0,69$, $p < 0,001$) korreliert (McGowan et al. 2012). Die Autoren schließen aus diesen Ergebnissen, dass der Grad

LITERATURÜBERSICHT

der Erkrankung durch die Höhe der Laborparameter ACTH und α -MSH widergespiegelt wird.

Da es bisher nur eine begrenzte Anzahl an Studien zu den Effekten der POMC-Produkte beim Pferd gibt, wird im Folgenden auch auf Studien bei anderen Spezies eingegangen.

2.2.2.1 Adrenocorticotropes Hormon (ACTH)

Das Peptidhormon ACTH besteht aus 39 Aminosäuren und entsteht durch die Spaltung von POMC durch die Prohormon-Convertase 1 (PC1). Die Prohormon-Convertase 2 (PC2), die nur in der Pars intermedia und nicht in der Pars distalis der Hypophyse exprimiert wird, spaltet das ACTH wiederum in die Peptidhormone α -MSH und Corticotropin-like intermediate lobe peptide (Carmalt et al. 2018). Da in der Pars intermedia ein großer Anteil des ACTHs durch die PC2 weiter konvertiert wird, ergibt es sich, dass der ACTH-Gehalt im Zwischenlappen physiologisch relativ zu dem Gehalt der weiteren Spaltprodukte klein ausfällt. Beim Vergleich von Hypophysengewebe von sechs an PPID erkrankten Pferden mit jenem von zehn gesunden Pferden wurde festgestellt, dass bei PPID die mRNA (messenger ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure)-Expression nicht nur von POMC (4,8-facher Anstieg, $p = 0,0083$), sondern auch von der PC1 (5,45-facher Anstieg, $p = 0,0007$) und PC2 (5,27-facher Anstieg, $p = 0,011$) signifikant hochreguliert war (Carmalt et al. 2018).

Bei an PPID erkrankten Pferden lässt sich trotz eines erhöhten ACTH-Spiegels im Blut kein Anstieg der Cortisolwerte und auch keine Hyperplasie der Nebennieren verzeichnen. Cordero et al. (2011) untersuchten die ACTH-Aktivität, indem sie von gesunden, euthanasierten Pferden die Nebennierenrinden explantierten und diese mit Plasma von neun gesunden und elf an PPID erkrankten Pferden inkubierten. Die ACTH-Konzentrationen im Plasma und die Cortisolmenge, die das jeweilige Explantat freisetzt, wurden mittels kommerzieller Radioimmunoassays gemessen und anschließend ins Verhältnis gesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass an PPID erkrankte Pferde sogar ein signifikant niedrigeres Verhältnis von Cortisol zu ACTH im Vergleich zu den Gesunden aufwiesen. Dies belegt die früh aufgestellte These, dass das aus der Pars intermedia

LITERATURÜBERSICHT

stammende ACTH im Vergleich zu jenem aus der Pars distalis über eine geringere Bioaktivität verfügt (Orth und Nicholson 1982, Cordero et al. 2012).

Die Ursache für die herabgesetzte biologische Aktivität ist nicht geklärt. Carmalt et al. (2018) zeigten, dass sich die mRNA-Teilsequenzen von POMC und ACTH zwischen erkrankten und gesunden Pferden nicht unterscheiden. Somit ist kein Nukleotid-Polymorphismus im codierenden Gen für die verminderte Bioaktivität des ACTHs bei PPID verantwortlich. Die Autoren vermuten, dass entweder eine post-translationale Modifikation des ACTHs, eine Herunterregulierung des Melanocortin-2-Rezeptors der Nebennierenrinde (MC2R, G-Protein gekoppelter Rezeptor, der durch die ACTH-Bindung verschiedene Enzyme stimuliert) oder ein anderer, bisher nicht identifizierter Mechanismus ursächlich sein könnten.

Eine weitere mögliche Erklärung für die herabgesetzte Bioaktivität könnte in der veränderten Freisetzung des ACTHs bei PPID liegen. So zeigten Schafe, bei denen experimentell die Verbindung zwischen Hypothalamus und Hypophyse getrennt wurde, eine erhöhte ACTH-Sekretion, welche die Autoren als Folge des Verlustes der dopaminergen Hemmung der Pars intermedia werteten. Gleichzeitig zeigten die Tiere keine erhöhte Cortisolausschüttung. Da es bei den Schafen im Experiment zu einer permanenten ACTH-Ausschüttung kam und nicht mehr die physiologische, pulsatile Freisetzung beobachtet wurde, vermuteten die Autoren, dass die fehlende Cortisolausschüttung mit der kontinuierlichen Freisetzung des ACTHs zusammenhing (Lincoln und Richardson 1998).

Inwiefern ACTH einen Einfluss auf den Glukose- bzw. Insulinstoffwechsel beim Pferd besitzt, ist nach Kenntnis der Autorin nicht bekannt. Dies ist von hoher klinischer Relevanz, da übermäßig hohe Insulinspiegel zur gefürchteten Hufrehe führen können (Asplin et al. 2007) und die Hufrehe bei etwa der Hälfte der PPID-Patienten auftritt (Ireland und McGowan 2018, Steel et al. 2022). Der Effekt von ACTH (1-39) und ACTH-Fragmenten (1-24, 18-39) auf die Insulin- und Glukoseantwort wurde zwischen normalgewichtigen sowie genetisch bedingt übergewichtigen, hyperglykämischen (ob/ob) Mäusen verglichen. Die intraperitoneale Injektion von ACTH 1-39 nach Fütterung löste einen deutlichen und schnellen Anstieg des Plasmainsulins in beiden

LITERATURÜBERSICHT

Mäuselinien aus, wobei der Effekt bei den ob/ob Mäusen signifikant größer war: Während die ob/ob Mäuse (n = 8) 10 Minuten nach der Injektion $46,1 \pm 4,1$ ng/ml Insulin aufwiesen, reagierten die normalgewichtigen Mäuse mit Insulinwerten von $5,5 \pm 1,5$ ng/ml (n = 10; p < 0,001). Die Plasmaglukosekonzentration sank bei den normalgewichtigen Mäusen ab, während sie bei den adipösen Mäusen sogar anstieg. Das ACTH-Fragment 1-24 zeigte ähnliche, aber geringere Effekte als das ACTH 1-39, während ACTH 18-39 keinen signifikanten Einfluss auf die Glukose- und Insulinkonzentrationen besaß. Daraus schlossen die Autoren zum einen, dass die ACTH-Wirkungen auf das Insulin- und Glukosegleichgewicht durch die N-terminale Sequenz 1-24 vermittelt werden und zum anderen, dass das ACTH bei ob/ob mutierten Mäusen zu überproportional höheren Insulinspiegeln führt, die gleichwohl einen Blutzuckeranstieg nicht verhindern. Obgleich keine Cortisolspiegel bestimmt wurden, gehen die Autoren davon aus, dass die rasche Hyperglykämie direkt durch das ACTH verursacht wurde, da Cortisoleffekte zeitlich später eintreten würden (Bailey und Flatt 1987).

Es wurden für das ACTH saisonal unterschiedliche Plasmakonzentrationen sowohl bei gesunden als auch – überproportional stärker - bei an PPID erkrankten Pferden und Ponys festgestellt (Cordero et al. 2012, McGowan et al. 2012, Secombe et al. 2017). Ein Anstieg der basalen ACTH-Werte wird im Zusammenhang mit abnehmender Tageslänge beobachtet (Copas und Durham 2012, McGowan et al. 2012). Beim Vergleich der einzelnen Kalenderwochen des Jahres zeigen die ACTH-Konzentrationen gesunder Pferde auf der Nordhalbkugel zwischen Mitte Juni und Anfang Dezember eine größere Variabilität als im Vergleich zum restlichen Jahr. Die größte physiologische Schwankungsbreite wurde in den Kalenderwochen 39 und 40 (letzte September- bzw. erste Oktoberwoche) festgestellt (Durham et al. 2021). Da die Diskrepanz der ACTH-Konzentrationen zwischen gesunden und kranken Pferden in den Herbstmonaten größer ist, wurde im „Handbuch Pferdepraxis“ (Brehm et al. 2017) im Kapitel „Störungen im hypothalamisch-hypophysären System“ empfohlen, diesen Zeitraum für die Diagnostik einer PPID mittels basaler ACTH-Spiegel zu nutzen (Fey 2017). Der starke Anstieg des immunologisch bestimmten ACTHs bei PPID im Herbst legt nahe, dass dieses aus der Pars intermedia stammt. Nach Kenntnis der Autorin wurden bislang keine

LITERATURÜBERSICHT

spezifischen Tests entwickelt, mit denen das aus der Pars distalis stammende ACTH von jenem aus der Pars intermedia unterschieden werden könnte.

2.2.2.2 Alpha-Melanozyten stimulierendes Hormon (α -MSH)

Das Peptidhormon α -MSH besteht aus 13 Aminosäuren und entsteht durch Spaltung des N-terminalen Abschnitts des ACTHs durch die ausschließlich in der Pars intermedia der Hypophyse vorhandene Prohormon-Convertase 2 (Ichiyama et al. 2000). Es ist am N-Terminus acetyliert und am C-Terminus amidiert (Catania et al. 2010).

Das α -MSH ist ein Hormon, das in zahlreichen Prozessen im Organismus eine Rolle spielt, weshalb in den letzten 20 Jahren viele Publikationen und experimentelle Studien (über 3000 Suchergebnisse bei PubMed zwischen 2003 und 2023) erschienen sind. Seinen Namen hat das α -MSH aufgrund seines Einflusses auf die Pigmentierung erhalten (Krude et al. 1999). Es aktiviert die Melaninsynthese, die die Haut- und Haarfarbe reguliert, indem es an den Melanocortin-1-Rezeptor (MC1R) bindet, der unter anderem von Melanozyten exprimiert wird (Luger et al. 1997, Al-Najim et al. 2018).

Insbesondere die immunmodulierenden und anti-inflammatorischen Eigenschaften, die das Hormon aufweist, geben Hoffnung auf einen zukünftigen therapeutischen Einsatz in der (Human-) Medizin (Brzoska et al. 2008, Singh und Mukhopadhyay 2014, Dinparastisaleh und Mirsaedi 2021). Aber auch seine Funktion in verschiedenen Stoffwechselfvorgängen, wie z.B. der Einfluss auf die Nahrungsaufnahme und das Körpergewicht, sorgt für zunehmendes wissenschaftliches Interesse (Al-Najim et al. 2018, Wu et al. 2023).

Unter anderem bei Menschen und Nagetieren wurde herausgefunden, dass α -MSH einen hemmenden Einfluss auf das Immunsystem besitzt, indem es die Funktion der neutrophilen Granulozyten verändert. Zum einen hemmt das Neuropeptid ihre Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies. Zum anderen senkt α -MSH ihre Chemotaxis. Letzteres geschieht, indem es die Produktion von cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) in den Neutrophilen erhöht (Catania et al. 1996, Oktar et al. 2004).

LITERATURÜBERSICHT

Auch bei Pferden, die an PPID erkrankt sind, wurde eine verminderte Funktion der Neutrophilen festgestellt, die durch verminderte Adhäsion und gestörte Oxidative Burst Aktivität (verringerte Produktion von Superoxiden) bedingt ist (McFarlane et al. 2015). Allerdings wurden in der Studie bei 13 an PPID Erkrankten und 24 gesunden Kontrollen keine signifikanten Korrelationen zwischen der Oxidativen Burst Aktivität und den absoluten α -MSH-, Insulin- und Cortisolkonzentrationen gefunden. Erst das Verhältnis der logarithmierten Insulinkonzentration zum α -MSH erwies sich als schwach positiv mit der Oxidativen Burst Aktivität korrelierend ($n = 35$, $r = 0,55$, $p < 0,001$).

Die Arbeitsgruppe von Anna Catania und James M. Lipton hat bereits vor über 20 Jahren wichtige Funktionen des α -MSH zusammengefasst wie z.B. den Einfluss auf Fieber, Akute-Phase-Antworten sowie auf anti-inflammatorische Modulationen (Catania und Lipton 1993, Lipton und Catania 1997). So wiesen Ichiyama et al. (2000) eine verminderte Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins Tumornekrosefaktor α (TNF- α) nach Injektion von α -MSH bei Mäusen nach. In weiteren Experimenten mit kultivierten Mikroglia-Zelllinien zeigten sie ebenfalls, dass α -MSH und ACTH die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 (Interleukin-6) hemmten sowie eine Herabregulierung der Stickstoffmonoxidproduktion bewirkten.

Auch bei an PPID erkrankten Pferden ($n = 14$) ließ sich eine verminderte Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α aus Leukozyten im Vergleich zu gleichaltrigen Gesunden ($n = 14$) nachweisen (McFarlane und Holbrook 2008). Hier sahen die Autoren einen möglichen Zusammenhang mit den hohen Plasmakonzentrationen an anti-inflammatorischen Hormonen wie insbesondere dem α -MSH bei PPID-kranken Pferden. Gleichzeitig wurde eine vermehrte Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8 bei an PPID erkrankten Pferden gezeigt. Diese Dysregulation könnte das vermehrte Auftreten an bakteriellen Infektionen bei erkrankten Pferden und Ponys erklären.

Eine Schlüsselrolle bei den immunmodulierenden Effekten spielt die Bindung des α -MSH an den Melanocortin-1-Rezeptor (MC1R), welcher nicht nur von Melanozyten, sondern auch von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen exprimiert wird (Manna et al. 2006). Durch die Aktivierung des Rezeptors kommt es zu einer Erhöhung des cAMP-

LITERATURÜBERSICHT

Levels, wodurch die Proteinkinase A aktiviert wird, was wiederum zur Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (engl.: nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells) führt (Catania et al. 2010, Singh und Mukhopadhyay 2014). Neben der Herunterregulierung der pro-inflammatorischen Zytokine stimuliert das α -MSH gleichzeitig die Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins Interleukin-10 (IL-10) und supprimiert die Chemotaxis (Singh und Mukhopadhyay 2014).

Außerdem zeigt α -MSH eine potente antipyretische Wirkung (Murphy et al. 1983). Die intrazerebroventrikuläre Behandlung von Ratten mit 1 μ g α -MSH konnte den Anstieg der Körperinnentemperatur, wie er bei Kontrolltieren durch intraperitoneal verabreichte Lipopolysaccharide (30 μ g/kg) ausgelöst wurde, erfolgreich verhindern. Dass dieser Effekt durch Co-Injektion des MC4R-selektiven Antagonisten HS014 verhindert wurde, zeigt, dass der MC4R die antipyretischen Effekte des zentral verabreichten α -MSH vermittelt (Sinha et al. 2004). Weitere Untersuchungen zu antipyretischen Effekten von zentral sowie peripher verabreichten POMC-Produkten (ACTH, α -MSH, γ -MSH) sind in dem Review von Roth et al. (2004) zusammengefasst. Das α -MSH weist folglich potente anti-inflammatorische und immunsuppressive Effekte auf, wodurch sich die erhöhte Infektanfälligkeit bei an PPID erkrankten Pferden erklären ließe.

Dieser These widersprechend wurde herausgefunden, dass α -MSH und insbesondere sein C-terminales Tripeptid (Lys-Pro-Val) direkte antimikrobielle Aktivität gegen verschiedene Mikroorganismen aufweist, welche im Review von Singh und Mukhopadhyay (2014) zusammengefasst werden. Es zeigt eine breit gefächerte Wirkung gegen bakterielle und fungale Pathogene wie z.B. Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Candida ssp. sowie Cryptococcus neoformans und agiert synergistisch mit Antibiotika verschiedener Klassen.

Des Weiteren besitzt α -MSH katabole und anorektische Wirkungen, welche über das zentrale Nervensystem vermittelt werden (Wu et al. 2023). Die Melanocortin-Rezeptoren 3 und 4 (MC3R und MC4R) werden ausschließlich im zentralen Nervensystem exprimiert (Denis et al. 2014). Die Bindung von α -MSH an diese Rezeptoren führt zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme bei Mäusen, Ratten und

LITERATURÜBERSICHT

sibirischen Hamstern (Schuhler und Ebling 2006). Im gemeinsamen Wirkungsweg mit Stoffwechselhormonen, wie z.B. dem von Adipozyten gebildeten Leptin, löst α -MSH ein Sättigungsgefühl aus, das bis zur Anorexie führen kann (Sobrinio Crespo et al. 2014). Zusammen mit Insulin und Leptin spielt α -MSH außerdem eine Rolle bei der Regulierung des Energiegleichgewichtes durch Einfluss auf den Glukose- und Lipidstoffwechsel (Schuhler und Ebling 2006, Zhang und Scarpace 2006, Denis et al. 2014). Dabei scheint α -MSH die Insulinsensitivität zu erhöhen. Studien zu diesen Effekten sind in dem Review von Al-Najim et al. (2018) zusammengefasst.

Durch einen Mangel an α -MSH entstehen eine gesteigerte Nahrungsaufnahme und ein herabgesetzter Energieverbrauch. Dies wird bei Menschen, Mäusen und Ratten mit einem erhöhten Risiko, Übergewicht zu entwickeln, in Zusammenhang gebracht (Hinney et al. 1999, Zhang und Scarpace 2006, Al-Najim et al. 2018). Bereits 1999 wurden durch Hinney et al. mehrere Mutationen des Melanocortin-4-Rezeptor-Gens entdeckt, die mit einer dominanten Form der Obesitas beim Menschen korrelieren. Zudem konnte der anabole Effekt experimentell durch intrazerebroventrikuläre Injektion des MC3R/MC4R-Antagonisten SHU9119 bei sibirischen Hamstern ausgelöst werden (Schuhler et al. 2004, Schuhler und Ebling 2006).

Bei der Untersuchung von 43 gesunden Pferden im Alter von über zehn Jahren wurde allerdings eine signifikante ($p = 0,001$), wenngleich schwache, positive Korrelation ($r = 0,49$) zwischen der α -MSH-Konzentration im Plasma und dem Body-Mass-Index (BMI) festgestellt. Insbesondere waren die α -MSH-Konzentrationen bei Pferden im höchsten Quartil des BMI signifikant höher ($p = 0,03$) als bei den Pferden im niedrigsten Quartil des BMI. Passend dazu zeigten übergewichtige Pferde signifikant höhere ($p = 0,02$) Plasma- α -MSH-Konzentrationen als untergewichtige Pferde. Die Autoren schlussfolgerten, dass möglicherweise Defekte im MC4R bei übergewichtigen Pferden zu einer übermäßigen Ausschüttung des primären Agonisten α -MSH führen (Donaldson et al. 2004).

Die Aktivität und Wirkung des α -MSH kann durch post-translationale Modifikationen wie z.B. Acetylierung oder Amidierung verändert werden. In Modellen mit Ratten, die fasteten, wurde jeweils die acetylierte bzw. die nicht-acetylierte Form des MSHs in den

LITERATURÜBERSICHT

dritten Hirnventrikel injiziert und anschließend die Futteraufnahme beurteilt. Es zeigte sich, dass die acetylierte Variante des MSHs, also das α -MSH, bei niedrigen Dosen die Futteraufnahme signifikant hemmt, während die nicht-acetylierte MSH-Form keinen Einfluss auf die Futteraufnahme der Ratten hatte (Tsuji und Bray 1989) bzw. erst bei sehr hohen Dosen einen Effekt zeigte (Abbott et al. 2000). Im Gegensatz dazu führte die nicht-acetylierte Form des MSHs nach Injektion bei Mäusen zu einer gesteigerten Futteraufnahme und Gewichtszunahme. Die Wirkung des MSHs war um das 10- bis 30-fache höher im Vergleich zur acetylierten (α) Form des MSHs (Shimizu et al. 1989).

Ähnlich wie das ACTH zeigt auch das α -MSH eine jahreszeitliche Rhythmik bei Pferden mit den höchsten Konzentrationen im Herbst (McFarlane et al. 2011). Bei Soayschafen konnten ähnliche saisonal unterschiedliche α -MSH-Konzentrationen festgestellt werden. Diese wurden in Zusammenhang mit Veränderungen des Körpergewichtes und der Futteraufnahme gebracht. Die Tiere nahmen im Sommer und Herbst, wenn ihre α -MSH-Konzentrationen bis zu 10-fach höher als im Winter waren, vermehrt Futter auf und an Gewicht zu. Die Autoren schlussfolgerten, dass sich die Schafe so auf die kargen metabolischen und nutritiven Bedingungen des Winters vorbereiten (Lincoln und Baker 1995).

Diese Studien unterstreichen, dass je nach Spezies und je nach Modifikation des Hormons mit sehr unterschiedlichen Wirkungen des α -MSHs zu rechnen ist.

2.2.2.3 Corticotropin-like intermediate lobe peptide (CLIP) und β -Zelltropin

Das Corticotropin-like intermediate lobe peptide (CLIP) entsteht als Spaltprodukt aus dem ACTH-Abschnitt mit dem C-Terminus und besteht aus den Aminosäuren 18 bis 39 des ACTHs. Durch eine weitere Spaltung mittels Prohormon-Convertase 2 entsteht das CLIP-Fragment der Aminosäuren 22 bis 39, das als β -Zelltropin bezeichnet wird. Zu beiden Spaltprodukten sind nach Kenntnis der Autorin nur wenige Daten hinsichtlich ihrer Wirkweisen bekannt.

CLIP besitzt einen Einfluss bei der Entstehung der REM (Rapid Eye Movement)-Schlafphase. In der Studie von Wetzel et al. (1997) wurde der Effekt von CLIP und dessen

LITERATURÜBERSICHT

N-terminalen Fragmenten ACTH 18-24 und ACTH 20-24 sowie seinem C-terminalen Fragment ACTH 25-39 nach intrazerebroventrikulärer Injektion auf die REM-Schlafepisoden bei Ratten untersucht. Die Autoren fanden heraus, dass das Pentapeptid ACTH 20-24 sowohl die Anzahl als auch die Dauer der REM-Schlafphasen erhöht, während das CLIP (ACTH 18-39) in seiner ursprünglichen Form nur einen positiven Effekt auf die Anzahl der REM-Schlafphasen hat. Zusätzlich wurde gezeigt, dass das C-terminale Fragment ACTH 25-39 ineffektiv war. Auf Grundlage dieser Ergebnisse mutmaßten die Autoren, dass kurze N-terminale CLIP-Fragmente endogene, hypnogene Faktoren darstellen, die den REM-Schlaf regulieren können.

Bereits 1983 wurde gezeigt, dass β -Zelltropin die Insulinfreisetzung aus den β -Zellen des Pankreas bei Ratten stimuliert und somit eine Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel spielt (Beloff-Chain et al. 1983). Zudem gibt es einen Zusammenhang zwischen erhöhten Konzentrationen an β -Zelltropin im Plasma und Übergewicht bei Rhesus-Affen (Morton et al. 1992). Eine kleine experimentelle Studie an Mäusehypophysen zeigte, dass Dopamin über D2-Rezeptoren die Freisetzung speziell des β -Zelltropins herunterregulierte (Eagle et al. 1993).

2.2.2.4 β -Lipotropin und β -Endorphin

Als direktes Spaltprodukt des POMCs entsteht am C-terminalen Fragment mittels Prohormon-Convertase 1 zunächst β -Lipotropin. Das Hormon besteht aus 91 Aminosäuren und spielt eine Rolle in der Lipolyse. Es dient als Vorläufermolekül für β -Endorphin, welches aus den Aminosäuren 61-91 des β -Lipotropins entsteht. Das Spaltprodukt besteht demnach aus 31 Aminosäuren, wird als β -Endorphin (1-31) bezeichnet und ist ein Agonist der M-Opioidrezeptoren. Dementsprechend besitzt es vor allem analgetische Wirkung und reduziert Schmerz-assoziierte Entzündungen (McFarlane 2014).

Bei der Untersuchung von zerebrospinaler Flüssigkeit und Plasma konnten Millington et al. (1988) feststellen, dass die Proben von an PPID erkrankten Pferden ($n = 10$) eine 60- bis 120-fach höhere Konzentration an immunreaktivem β -Endorphin aufwiesen als jene

LITERATURÜBERSICHT

der Kontrollpferde ($n = 18$). Diese exzessive Freisetzung des potenten Opioid-Agonisten β -Endorphin (1-31) wird als Ursache für das häufig reduziert erscheinende Schmerzempfinden und die Verhaltensänderungen genannt, insbesondere die Lethargie, die bei an PPID erkrankten Pferden zu beobachten ist (Millington et al. 1988).

Die N-terminale Sequenz des β -Endorphins sorgt für die Entstehung von Analgesie, während sein C-terminales Tetrapeptid die Potenz der Analgesie bestimmt. Die Wirkung des β -Endorphins kann allerdings durch Modifikationen verändert werden. Demnach führt die N-Acetylierung zu seiner Inaktivierung und eine Proteolyse einzelner Aminosäuren am C-Terminus zu einer verminderten analgetischen Potenz (Deakin et al. 1980).

Bereits 1977 wurde gezeigt, dass β -Endorphin die Futteraufnahme bei Ratten steigert (Grandison und Guidotti 1977). Wie beim α -MSH wurde eine veränderte Wirkung durch Acetylierung festgestellt. In einem Modell mit gefütterten Ratten wurde jeweils die acetylierte bzw. die nicht-acetylierte Form des β -Endorphins in den dritten Gehirnvtrikel injiziert und anschließend die Futteraufnahme beurteilt. Es zeigte sich, dass die nicht-acetylierte Variante des β -Endorphins bei niedrigen Dosen die Futteraufnahme stimuliert. Dagegen hemmt es bei hohen Dosen die Futteraufnahme initial, während N-Acetyl- β -Endorphin keinen Effekt auf die Futteraufnahme der Ratten hatte (Tsujii und Bray 1989).

Bei der Untersuchung von Soayschafen wurde eine enge Verbindung zwischen wöchentlichen Änderungen der Plasmakonzentrationen von α -MSH und β -Endorphin festgestellt. Dies ließ die Autoren schlussfolgern, dass eine Co-Sekretion der beiden POMC-Produkte aus den melanotropen Zellen besteht (Lincoln und Baker 1995).

2.3 TRH-STIMULATIONSTEST BEI PPID

Die Diagnostik der PPID sollte grundsätzlich durch die Kombination von Anamnese, Signalement und klinischem Bild des Patienten mit labordiagnostischen Untersuchungen erfolgen. Die Messung des basalen ACTH-Wertes aus Plasma wird routinemäßig durchgeführt. Es hat sich allerdings gezeigt, dass die Diagnosestellung bei

LITERATURÜBERSICHT

Pferden im frühen oder subklinischen Stadium der Erkrankung aufgrund von fraglichen bzw. mild ausgeprägten Symptomen und/oder uneindeutigen basalen ACTH-Werten falsch negativ sein kann. Insbesondere in solchen Fällen wird der TRH-Stimulationstest (TRH = Thyreotropin-Releasing-Hormon) als akkurateres Verfahren empfohlen (Horn et al. 2021, Kirkwood et al. 2022b).

Es gibt mehrere Veröffentlichungen, die einen guten Überblick über weitere bisher untersuchte, diagnostische Tests geben (Durham et al. 2014, McFarlane 2019). Die Equine Endocrinology Group (EEG) führt in ihren aktuellen „Recommendations for the Diagnosis and Management of Pituitary Pars Intermedia Dysfunction“ (Hart et al. 2023) nur noch die Messung des basalen ACTH-Wertes sowie die ACTH-Bestimmung nach TRH-Injektion als Diagnostika auf. Da sich die eigene Arbeit labordiagnostisch vorrangig mit dem TRH-Stimulationstest befasst, wird im Folgenden ausschließlich auf diesen eingegangen.

2.3.1 Wirkprinzip des TRHs

Das TRH ist ein natürlicher Releasing-Faktor und bekannt dafür, insbesondere Funktionen (neuro-) endokriner Zellen im Hypophysenvorderlappen (HVL), aber auch im zentralen und peripheren Nervensystem zu regulieren. Das Hormon, welches auch Thyreoliberin oder Protirelin genannt wird, entsteht im Hypothalamus und kontrolliert hauptsächlich über die Regulation des Thyreotropins (TSH) aus dem HVL die Synthese und Freisetzung von Schilddrüsenhormonen. Es wirkt über G-Protein-gekoppelte TRH-Rezeptoren, von denen es drei Subtypen (Typ 1 bis 3) gibt (Trubacova et al. 2022). TRH Typ 1-Rezeptor mRNA wurde sowohl in den corticotropen Zellen der Pars distalis als auch in den melanotropen Zellen der Pars intermedia bei gesunden und an PPID erkrankten Pferden nachgewiesen (McFarlane et al. 2006). Intravenös verabreichtes TRH stimuliert eine signifikante Freisetzung von ACTH und α -MSH aus der Pars intermedia im Vergleich zu den Basalwerten (Funk et al. 2011), wobei die Ausschüttung der beiden POMC-Produkte signifikant höher bei an PPID Erkrankten (n = 7) als bei Gesunden (n = 16) ist (McFarlane et al. 2006, Durham 2016).

2.3.2 Testprinzip und Vorbereitung des TRH-Stimulationstests

Die EEG hat sich vorgenommen, ihre „Recommendations for the Diagnosis and Management of Pituitary Pars Intermedia Dysfunction“ alle zwei Jahre zu überarbeiten. Die folgenden Angaben beziehen sich auf die bei der Erstellung der eigenen Arbeit relevanten Protokolle zur Durchführung des TRH-Stimulationstests sowie die empfohlenen Cut-off-Werte von 2023 (Hart et al. 2023).

Das Testprinzip beruht auf der Messung des ACTH-Anstiegs nach intravenöser TRH-Injektion zu genau festgelegten Zeitpunkten. Die empfohlene Dosierung beträgt 1 mg TRH pro Pferd mit einem Körpergewicht über 250 kg und 0,5 mg TRH für Pferde bzw. Ponys, deren Gewicht unter 250 kg liegt.

Entsprechend der oben genannten Empfehlungen von 2023 sollte der TRH-Stimulationstest zur PPID-Diagnostik durchgeführt werden, nachdem die Pferde zuvor Heu, aber für mindestens zwölf Stunden kein Kraftfutter erhalten haben. Allerdings wurde in der Studie von Diez de Castro et al. (2014) herausgefunden, dass die Fütterung von Alfalfa-Heu vor Probenentnahme einen Einfluss auf die ACTH-Werte nach TRH-Stimulationstest hat. Bei 50 Pferden wurde der basale ACTH-Wert vor (12 Stunden nüchtern) und 2 Stunden nach Fütterung des Heus bestimmt. Bei sechs weiteren Pferden wurde zusätzlich eine Cross-over-Studie mit mehreren TRH-Stimulationstests durchgeführt. Nach Fütterung zeigten die Pferde sowohl bei den basalen ($17,1 \pm 1,8$ versus $46,1 \pm 7,6$ pg/ml, $p = 0,003$) als auch bei den TRH-stimulierten ACTH-Werten ($124,1 \pm 21,3$ versus $192,6 \pm 33,1$ pg/ml, $p = 0,029$) signifikant höhere Ergebnisse als nach 12-stündiger Nüchternphase vor der Testung. In der eigenen Arbeitsgruppe konnte hingegen gezeigt werden, dass die Fütterung von 0,34 kg/ 100 kg Körpergewicht Wiesenheu 2 Stunden vor dem TRH-Test im Vergleich zu 8-10 Stunden Nüchternphase keinen signifikanten Unterschied in den basalen ACTH-Konzentrationen bewirkte (Stallenberger 2020). Auch Drozdowska et al. (2023) kamen zu dem Ergebnis, dass die Fütterung von Heu bzw. Heu und Getreide keinen signifikanten Einfluss auf basale ACTH-Konzentrationen ($p = 0,07$) und ACTH-Konzentrationen 10 Minuten nach TRH-Gabe ($p = 0,5$) besitzt.

LITERATURÜBERSICHT

2.3.3 Grenzwerte nach TRH-Stimulationstest

Die derzeit empfohlenen Probenentnahmen erfolgen direkt vor und 10 Minuten nach der intravenösen TRH-Injektion.

Ähnlich wie bei der Bewertung des basalen ACTH-Wertes empfehlen die Autoren der EEG anhand der ACTH-Werte 10 Minuten nach TRH-Applikation eine Einteilung in drei Kategorien (Hart et al. 2023):

- | | |
|---|-----------------------|
| 1. <i>PPID unlikely</i> („negativ“): | ACTH < 100 pg/ml |
| 2. <i>Interpretive Zone</i> („Graubereich/ <i>equivocal</i> “): | ACTH: 100 - 200 pg/ml |
| 3. <i>PPID likely</i> („positiv“): | ACTH > 200 pg/ml. |

Die Arbeitsgruppe weist darauf hin, dass diese Grenzwerte für Analysen mittels Immulite® 2000 XPi auf der Nordhalbkugel nur für den Zeitraum von Januar bis Juni gelten. In den Monaten Juli bis Dezember sollte der TRH-Stimulationstest aufgrund vieler falsch positiver Ergebnisse bzw. fehlender Cut-off-Werte nur zur Identifizierung negativer Fälle genutzt werden. In den Empfehlungen der Arbeitsgruppe vier Jahre zuvor (Schott et al. 2019) galt der TRH-Stimulationstest von Mitte November bis Mitte Juli als verlässlich und der Zehnminuten-ACTH-Grenzwert für PPID negativ klassifizierte Pferde lag um 10 pg/ml höher:

- | | |
|---------------|-----------------------|
| 1. Negativ: | ACTH < 110 pg/ml |
| 2. Equivocal: | ACTH: 110 – 200 pg/ml |
| 3. Positiv: | ACTH > 200 pg/ml. |

Die Anpassung des unteren Cut-off-Wertes wurde damit begründet, dass die ACTH-Messungen mit dem neueren Immulite® 2000 XPi Immunoassay durchgeführt werden, welcher leicht niedrigere ACTH-Werte misst als der zuvor verwendete Immulite® Immunoassay.

Von einigen Autoren wurde auch der Zeitpunkt 30 Minuten nach TRH-Injektion zur PPID-Diagnostik genutzt. Für die ACTH-Konzentration wurden allerdings unterschiedliche Grenzwerte publiziert: In einer Studie, die TRH-Stimulationstests bei insgesamt 48 gesunden und kranken Pferden verglich, wurde ein Cut-off-Wert von 35 pg/ml für die ACTH-Konzentration 30 Minuten nach TRH-Injektion angegeben (Beech et al. 2007).

LITERATURÜBERSICHT

Hingegen empfahlen die 2013 veröffentlichten „Recommendations for the Diagnosis and Management of Pituitary Pars Intermedia Dysfunction“ einen Cut-off-Wert von 65 pg/ml für ACTH (Analytik mit dem Immulite® 1000) 30 Minuten nach der intravenösen TRH-Gabe (Durham 2016). In einer 2021 veröffentlichten, in Australien durchgeführten Studie wurden bei 72 Kontrollen und 34 PPID-kranken Pferden jeweils über einen Zeitraum von einem Jahr monatlich die ACTH-Konzentrationen basal und 30 Minuten nach TRH-Gabe bestimmt. Auf Grundlage dieser Messungen mit dem Immulite® 1000 wurden neue Cut-off-Werte und Referenzintervalle berechnet. Die Cut-offs für den Herbst (März in Australien) betragen demnach 58,3 pg/ml basal und 229,1 pg/ml 30 Minuten nach TRH-Gabe. Für den Winter (Juni in Australien) wurden ACTH-Grenzwerte von 24,0 pg/ml basal und 53,2 pg/ml 30 Minuten nach TRH-Gabe angegeben (Horn et al. 2021). In den aktuellen Empfehlungen der EEG (Hart et al. 2023) sind nach langer Zeit wieder neue Cut-offs für die ACTH-Konzentrationen 30 Minuten nach TRH-Injektion erschienen. Auf diese wird im Kap. 4.3.3.4 näher eingegangen.

Zudem wurde die Wiederholbarkeit des TRH-Stimulationstests zur PPID-Diagnostik überprüft, wobei die oben genannten Cut-offs (Horn et al. 2021) für die ACTH-Werte 30 Minuten nach TRH-Gabe verwendet wurden. Bei insgesamt 20 Pferden, die zuvor als entweder an PPID erkrankt oder als Kontrollpferd kategorisiert wurden, wurden TRH-Stimulationstests in zwei Studienperioden durchgeführt. Zum einen erfolgten die TRH-Tests jeweils am siebten Tag vor und nach der Wintersonnenwende (äquivalent in Deutschland mit dem 21./22. Dezember). Zum anderen wurden die TRH-Tests jeweils acht Tage vor und nach der Tagundnachtgleiche im Herbst (äquivalent in Deutschland mit dem 22./23./24. September) durchgeführt. Zwischen den beiden TRH-Tests im Winter ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,6$) und es ergab sich eine sehr gute Wiederholbarkeit. Dagegen zeigten sich im Herbst signifikant niedrigere ACTH-Dreißigminutenwerte ($p = 0,02$) beim zweiten Test und somit mehr Variabilität der ACTH-Werte zwischen den beiden Testzeitpunkten. Im Winter wiesen 2 von 14 Pferden, die in der ersten Woche als an PPID erkrankt klassifiziert wurden, beim zweiten Test ACTH-Konzentrationen (basal und 30 Minuten nach TRH) unter den Cut-offs auf. Hingegen wiesen im Herbst 4 von 12 Pferden, die beim ersten TRH-Test als an PPID

LITERATURÜBERSICHT

erkrankt klassifiziert wurden, beim zweiten TRH-Test ACTH-Konzentrationen unterhalb der Cut-off-Werte auf (Kam et al. 2021).

Aufgrund dessen, dass es bisher nur wenige Daten zum TRH-Stimulationstest im Herbst gibt und die ACTH-Werte in dieser Zeit eine erhöhte Variabilität aufweisen, wurden die Tests in der eigenen Studie außerhalb der Herbstmonate durchgeführt.

2.3.4 Arzneimittelrechtliche Aspekte

Das TRH ist in Deutschland als diagnostische Substanz in der Humanmedizin zugelassen. Das Arzneimittel ist in der sogenannten „Positivliste“ (Verordnung (EG) Nr. 1950/2006) gelistet und muss zum Einsatz beim Pferd umgewidmet werden. Es sind einige leichte unerwünschte Arzneimittelwirkungen beim Pferd in den ersten Minuten nach intravenöser Applikation beschrieben. Hierzu zählen Gähnen, Lippenlecken, Flehmen, Husten und Muskelzittern (Schorn 2019, Stallenberger 2020).

2.4 PERGOLID BEI PPID

Für die Therapie der PPID wird der Dopaminagonist Pergolid als Pergolidmesilat eingesetzt. In Deutschland waren zu Beginn der eigenen Studie 2020 zwei Präparate für die PPID-Behandlung zugelassen: Prascend® 1 mg Tabletten für Pferde der Firma Boehringer Ingelheim Vetmedica (Ingelheim) und Pergoquin® 1 mg Tabletten für Pferde der Firma WDT (Garbsen). Seit 2023 ist zudem das Präparat Pergosafe® 0,5 und 1 mg Filmtabletten für Pferde der Firma Dechra (Aulendorf) zugelassen. Die Tabletten werden einmal täglich oral eingegeben, wobei die übliche Anfangsdosis mit 2 µg/kg Körpergewicht angegeben wird.

2.4.1 Wirkprinzip des Pergolids

Pergolid ist ein synthetisches Ergot-Derivat. Seine Struktur basiert auf Ergolin, dem Grundstoff der Mutterkornalkaloide. Pergolid wirkt wie der Neurotransmitter Dopamin und bindet als Agonist am D1-, D2- und D3-Rezeptor, wobei die Affinität zum

LITERATURÜBERSICHT

inhibitorischen D2-Rezeptor am größten ist (Tadori et al. 2011, Rendle et al. 2019). D2-Rezeptoren befinden sich im zentralen Nervensystem und im Hypophysenvorderlappen. In der Pars intermedia werden sie auf den melanotropen Zellen exprimiert (McFarlane et al. 2017). Neben den Dopamin-Rezeptoren hat Pergolid außerdem Effekte an adrenergen Rezeptoren sowie am Serotonin-(5-Hydroxytryptamin-, 5-HAT-)Rezeptor (Durham 2017).

Bei der PPID wirkt Pergolid dem Dopaminmangel in der Pars intermedia der equinen Hypophyse entgegen (Orth und Nicholson 1982), wodurch die Synthese und Freisetzung der POMC-Produkte aus den melanotropen Zellen normalisiert wird, was wiederum die klinischen Symptome verbessert (Donaldson et al. 2002, Tatum et al. 2020). Die eigentliche Ursache, die Degeneration der dopaminergen Nervenzellen, kann nach aktuellem Wissensstand nicht behoben werden. Computertomografische Untersuchungen der Hypophyse bei sechs Pferden konnten im intraindividuellen Vergleich vor und sechs Monate nach Therapie mit 1 mg Pergolid pro Tag keine Verkleinerung der Hypophyse nachweisen (Pease et al. 2011).

2.4.2 Effekte des Pergolids beim Pferd

Mehrere Studien zeigten, dass die Gabe von Pergolid bei PPID-Patienten sowohl zu einem teils signifikantem Abfall der ACTH-Konzentrationen als auch zu einer Besserung der klinischen Symptome führte (Donaldson et al. 2002, McFarlane et al. 2017, Schorn 2019, Tatum et al. 2020, Miller et al. 2021).

Das öffentlich zugängliche „CORRECTED FREEDOM OF INFORMATION SUMMARY, NEW ANIMAL DRUG APPLICATION 141-331“ (<https://animaldrugsatfda.fda.gov/adafda/app/search/public/document/downloadFoi/890>, letzter Zugriff August 2024) wurde im Rahmen der Pergolidzulassung in den USA erstellt und bietet umfangreiche Informationen zum Einsatz der Pergolidmesilat-Tabletten und wird im Folgenden mit „NADA 141-331 (2011)“ abgekürzt (Andrews et al. 2011). In der Feldstudie wurde die Wirkung des Medikamentes bei 113 Pferden mit PPID evaluiert. Bei 76,1 % (n = 86) wurde ein Therapieerfolg festgestellt, welcher durch den Vergleich von den

LITERATURÜBERSICHT

Ausgangswerten (endokrinologische Laboruntersuchung und klinischer Score) mit den Ergebnissen nach 180 Tagen oraler Pergolidgabe ermittelt wurde.

Es gibt aktuell keinen Hinweis darauf, dass die Therapie mit Pergolid die Immunabwehr bei Pferden verbessert. Dies wurde beim Vergleich von neun PPID-kranken Pferden ohne Therapie mit neun PPID-kranken Pferden mit Therapie geschlussfolgert, bei denen in einem Zeitraum von 15 Monaten regelmäßige Blutuntersuchungen und Tests (großes Blutbild, Myeloperoxidasekonzentration, Expression von Zytokinen etc.) durchgeführt wurden (Miller et al. 2021).

Im Speziellen wird auf die Pergolideffekte im Rahmen der Diskussion der Ergebnisse der Therapiestudie (Kap. 4.3.4) näher eingegangen.

2.4.3 Pharmakokinetik und -dynamik

Die Halbwertszeit von Pergolid bei Pferden interessiert vor allem nach oraler Gabe, da das Medikament in praxi mit etwas Futter oder per Maulspritze verabreicht wird. Gehring et al. (2010) gaben sechs gesunden Stuten nach einer 8-stündigen Nüchternphase einmalig morgens 10 µg/kg Pergolid oral, also das 5-fache der empfohlenen Anfangsdosis, und berechneten eine durchschnittliche Halbwertszeit von 27 ± 10 Stunden im Plasma. Hingegen untersuchten McFarlane et al. (2017) die Wirkstoffgabe über sechs Monate bei sechs an PPID erkrankten Pferden. Die Probanden erhielten zunächst für zwei Monate einmal täglich 2 µg/kg und anschließend für weitere vier Monate einmal täglich 4 µg/kg Pergolid oral. Die Plasmaspiegel nach der letzten Gabe des Medikamentes ergaben eine ähnliche Halbwertszeit von 24 ± 10 Stunden. Andere Ergebnisse erhielten Rendle et al. (2019), die sechs an PPID erkrankte Pferde über 18 Tage einmal täglich mit 4 µg/kg Pergolid oral behandelten. Sie gaben eine Halbwertszeit von unter 12 Stunden im Plasma an, allerdings ohne genaue Daten zu nennen.

Aufgrund des unterschiedlichen Ansprechens auf Pergolid wird dazu geraten, den Effekt der Therapie zu kontrollieren und gegebenenfalls die Dosis individuell anzupassen. Hierfür werden regelmäßige - laut Herstellerempfehlung anfangs alle vier bis sechs

LITERATURÜBERSICHT

Wochen - tierärztliche Kontrollen des klinischen Bildes und der ACTH-Werte empfohlen. Bei schlechtem oder nur geringem Ansprechen sollte die Dosis um 0,5 mg pro 500 kg KGW und Tag erhöht werden. Die NADA 141-331 (2011) gibt eine mögliche Spannbreite der individuell ausreichenden Dosierung von 0,6 bis 10 µg/kg KGW täglich an (Andrews et al. 2011).

In der pharmakokinetischen Studie von Gehring et al. (2010) wurde bei sechs gesunden Stuten einmalig Pergolid in der hohen Dosis von 10 µg/kg oral verabreicht. Das Konzentrationsmaximum wurde bei allen Probanden innerhalb der ersten Stunde festgestellt. Auch in den Untersuchungen von McFarlane et al. (2017) zeigten die Pferde (n = 6) im Rahmen einer oralen Therapie mit 2 mg Pergolid täglich ein Konzentrationsmaximum bereits nach $0,53 \pm 0,31$ Stunden. Diese Untersuchungen zeigen, dass Pergolid schnell resorbiert wird und der maximale Blutspiegel zeitnah nach dem Therapiestart erreicht wird, weshalb von einer schnellen endokrinen Antwort bei Pferden auf das Medikament auszugehen ist. So konnte in der eigenen Arbeitsgruppe bereits 6 Stunden nach erster oraler Pergolidgabe bei zehn PPID-Patienten ein signifikanter ACTH-Abfall nachgewiesen werden (Schorn 2019).

Zudem zeigte die Feldstudie der NADA 141-331 (2011), dass 47 von 113 Pferden (41,6 %) nach 90-tägiger Pergolidgabe in der Initialdosis (2 µg/kg KGW) eine Dosiserhöhung (4 µg/kg KGW) aufgrund weiterhin abnormer Laborergebnisse benötigten (Andrews et al. 2011). Daher ist bei einem großen Anteil der erkrankten Tiere mit mindestens einer erforderlichen Dosisanpassung zu rechnen.

2.4.4 Unerwünschte Wirkungen

Es sind unerwünschte Wirkungen beschrieben, die meist in den ersten Tagen nach Beginn der Pergolidgaben, aber auch nach einer Erhöhung der Dosis auftreten können. In den Beipackzetteln (Prascend®, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Ingelheim bzw. Pergoquin®, WDT, Garbsen) wird Folgendes angegeben: „In seltenen Fällen wurden bei Pferden Inappetenz, vorübergehende Anorexie und Lethargie, leichte Anzeichen einer zentralnervösen Störung (z.B. leichte Niedergeschlagenheit oder leichte Ataxie),

LITERATURÜBERSICHT

Diarrhoe und Koliken beobachtet. In sehr seltenen Fällen wurde von Schwitzen berichtet“.

In der Feldstudie der NADA 141-331 (2011) wurden zahlreiche unerwünschte Wirkungen beschrieben, wobei Inappetenz bzw. verminderter Appetit mit 32,8 % am häufigsten dokumentiert wurde. Das Symptom trat in den meisten Fällen vorübergehend und innerhalb des ersten Monats auf (Andrews et al. 2011). Beim Auftreten von Nebenwirkungen wird von den Herstellern eine Dosisreduktion oder das kurzzeitige Absetzen der Tabletten mit anschließendem langsamen wieder Einschleichen der erforderlichen Dosis empfohlen, beginnend mit 50 % der eigentlichen Menge.

In der Humanmedizin wurde Pergolidmesilat zur Behandlung des Morbus Parkinson eingesetzt. Es wurde 2007 in den USA vom Markt genommen, da es mit fibrotischen Veränderungen der Herzklappen und Herzklappeninsuffizienzen in Verbindung gebracht wird (Tran et al. 2015, Oury et al. 2020). In Deutschland gibt es ebenfalls seit langem kein Präparat mehr zur Behandlung von Menschen auf dem Markt. Bei an PPID erkrankten Pferden wurden nach einer Therapiedauer von drei bis acht Monaten mit Pergolid keine Störungen der Ventrikelfunktion oder Rückflüsse durch die Herzklappen festgestellt (Gehlen et al. 2021).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die Ziele der eigenen Studie waren:

1. Der Vergleich zweier TRH-Dosierungen (0,5 µg/kg und 2 µg/kg) im Hinblick auf die ACTH-Ausschüttung.
2. Die Bestimmung von Pergolideffekten im Vergleich zu Placebogaben bei an PPID erkrankten Pferden und Ponys.

3.1 MATERIAL UND METHODEN

3.1.1 Studiendesign

Bei dem Vorhaben handelte es sich um zwei aufeinanderfolgende Studienteile. Nach Voruntersuchungen erfolgte zunächst der TRH-Dosisvergleich (Studienteil 1). Bei Erfüllung der Ein- und Ausschlusskriterien folgte direkt im Anschluss der Placebo-kontrollierte Therapieversuch mit Pergolid (Studienteil 2). Bei Teilnahme an beiden Teilen belief sich der Studienzeitraum pro Proband auf maximal 14 Wochen (Abb. 1).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

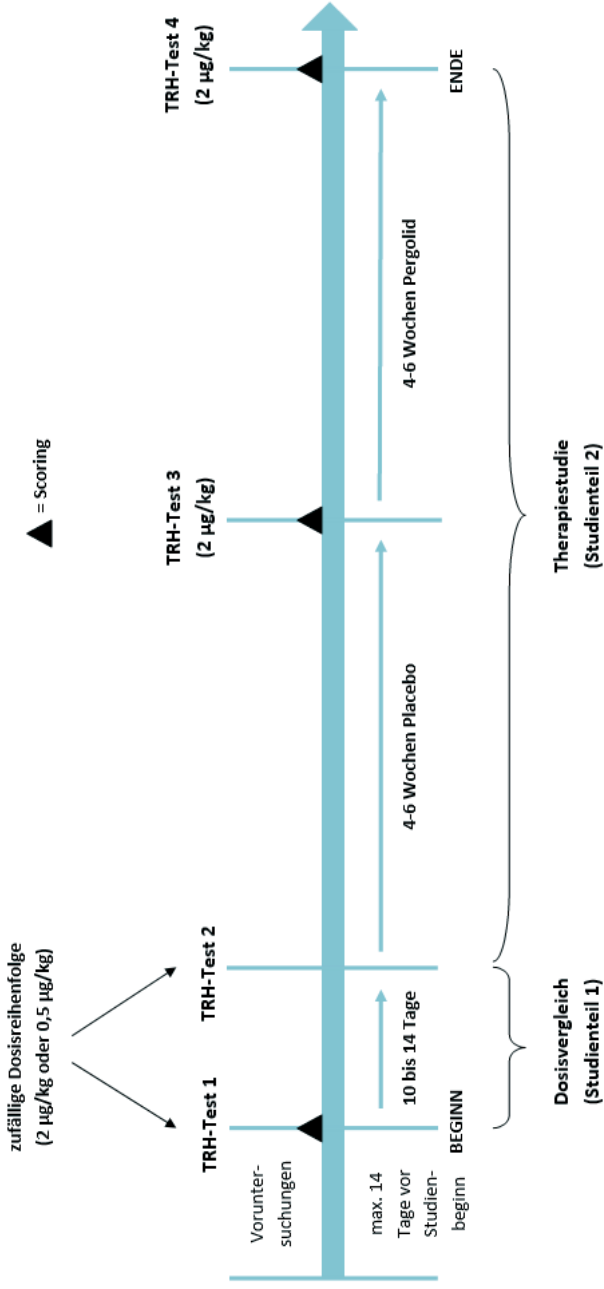


Abb. 1: Zeitlicher Ablauf beider Studienteile

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1.1.1 TRH-Dosisvergleich

Zunächst wurde der TRH-Dosisvergleich in Form einer prospektiven, randomisierten Studie im Cross-over-Design durchgeführt. Es sollte geprüft werden, ob die bisher übliche Menge von 1 mg TRH pro Pferd auf ein Viertel reduziert werden kann, ohne dass die freigesetzten ACTH-Konzentrationen signifikant verringert werden. Geht man von einem durchschnittlichen Körpergewicht (KGW) von 500 kg pro Pferd aus, würde die laut EEG empfohlene Menge von 1 mg TRH pro Pferd (Hart et al. 2023) einer Dosierung von 2 µg/kg KGW entsprechen. Da in dieser Studie an das individuelle Körpergewicht angepasste Dosierungen verwendet wurden, ergab sich für ein Viertel der üblichen TRH-Menge eine Dosierung von 0,5 µg/kg KGW.

Über einen Venenverweilkatheter erhielten die Probanden in zufälliger Reihenfolge entweder zuerst 0,5 µg/kg KGW oder 2 µg/kg KGW TRH intravenös. Im Zeitraum von 2 Stunden erfolgten insgesamt acht Blutentnahmen: vor (0), 5, 10, 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach TRH-Applikation. Zwischen beiden Testdurchläufen wurde eine Wash-out-Phase von 10 bis 14 Tagen eingehalten.

3.1.1.2 Therapiestudie

Im zweiten Teil wurde eine Placebo-kontrollierte Therapiestudie über jeweils vier bis sechs Wochen durchgeführt. Hierbei sollte geprüft werden, inwiefern sich der klinische Score (Kap. 3.1.5 und Anhang Kap. 8.1) und die labordiagnostischen Untersuchungen zwischen den Zeitpunkten vor und nach Placebogabe sowie nach Verumgabe unterschieden.

Alle Probanden, die im TRH-Dosisvergleich nicht eindeutig negativ auf PPID getestet wurden, sollten in die Therapiestudie aufgenommen werden. Die Kategorisierung als eindeutig *PPID unlikely* erfolgte entsprechend der Empfehlungen der EEG (Hart et al. 2023) anhand der Ergebnisse des TRH-Tests mit der etablierten Dosierung von 2 µg/kg KGW. Die Besitzer waren verblindet und wussten somit nicht, wann sie das Placebo bzw. Verum verabreichten. Alle Pferde erhielten als Erstes einmal täglich das Placebo für einen Zeitraum von vier bis sechs Wochen oral. Anschließend erfolgten die

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Kontrolluntersuchungen und der dritte TRH-Test. Danach wurden die Besitzer gebeten, ihren Pferden einmal täglich andere Tabletten (das Verum Pergolid) über den gleichen Zeitraum oral zu geben. Im Anschluss erfolgten erneute Kontrolluntersuchungen einschließlich des vierten TRH-Tests.

Die Tabletten wurden vorab der Ursprungspackung entnommen und in verschließbare Tablettendosen umgefüllt, um die korrekte, einmal tägliche Verabreichung zu erleichtern. Am Tag des zweiten TRH-Tests der Dosisvergleichsstudie erhielten die Besitzer die Tablettendosen mit den Placebos. Falls die Kategorisierung anhand der ACTH-Zehnminutenwerte noch ausstand, warteten die Besitzer ein bis maximal vier Tage bis zum Start der Tablettengabe. Erst nach Abschluss des dritten TRH-Tests erhielten die Besitzer die Tablettendosen mit dem Verum. Es wurde jeweils die Tablettenanzahl für den Maximalzeitraum von 42 Tagen abgegeben. Als Placebo wurden Biotin H forte 10 mg Tabletten der Firma CANEA Pharma GmbH (Hamburg) verwendet. Das Pergolid wurde in Form von Pergoquin® 1 mg Tabletten für Pferde der Firma WDT (Garbsen) verabreicht (Abb. 2).



Abb. 2: Links: Biotin H forte (Placebo), rechts: Pergoquin®

Die jeweilige Pergoquin®-Anzahl bzw. -Stückelung wurde entsprechend den in Tab. 1 aufgeführten Herstellerangaben vorgenommen. Die Dosierung entsprach im Mittel 2 µg/kg KGW Pergolidmesilat pro Tag. Die gleiche Tablettenanzahl bzw. -stückelung wurde für die Abgabe des Placebos verwendet.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tab. 1: Tägliche Tablettendosis nach Herstellerangabe (Pergoquin®, WDT, Garbsen)

Körpergewicht des Pferdes	Anzahl an Tabletten	Pergolid-menge	Dosis / kg KGW	Anzahl an Probanden
200 – 300 kg	½	0,5 mg	1,7 – 2,5 µg	-
301 – 400 kg	¾	0,75 mg	1,9 – 2,5 µg	2
401 – 600 kg	1	1,0 mg	1,7 – 2,5 µg	8
601 – 850 kg	1 ½	1,5 mg	1,8 – 2,5 µg	3
851 – 1000 kg	2	2,0 mg	2,0 – 2,4 µg	-

3.1.2 Probanden

Entsprechend der biometrischen Planung (Kap. 3.1.2.1) sollten 18 Probanden an der Studie zum Dosisvergleich und 13 PPID-Patienten an der Therapiestudie teilnehmen. Es war geplant, die Probanden vorwiegend über persönliche Kontakte und direkte Ansprache der Besitzer durch die Autorin zu rekrutieren. Die Untersuchungen und Tests sollten in den Heimatställen der Pferde im Gießener Umland durchgeführt werden.

3.1.2.1 Biometrische Planung

Die Probandenanzahlen ergaben sich aus den vorab erfolgten biometrischen Berechnungen, die durch Herrn Dr. Klaus Failing, AG Biomathematik und Datenverarbeitung des Klinikums Veterinärmedizin an der JLU Gießen, mithilfe des Programms BiAS für Windows (Ackermann 2020) durchgeführt wurden.

Auf Grundlage der intraindividuell möglichen Wiederholungsmessungen in beiden Versuchsabschnitten ergab sich für den TRH-Dosisvergleich ein notwendiger Stichprobenumfang von $n = 18$ und für die Therapiestudie ein notwendiger Stichprobenumfang von $n = 13$. Der Unterschied zwischen den beiden Stichprobenumfängen liegt in den unterschiedlichen Fragestellungen begründet. Für die Berechnung des Stichprobenumfangs für den TRH-Dosisvergleich wurde die Hypothese zugrunde gelegt, dass sich die Flächen unter den ACTH-Kurven (Areas under the curves, AUCs) über die Zeit zwischen den beiden TRH-Dosierungen nicht unterscheiden. Dafür sollten die Konfidenzintervalle verglichen werden. Für die Therapiestudie wurde die

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Hypothese aufgestellt, dass nach der Gabe des Verums signifikant geringere AUCs vorliegen als nach Gabe des Placebos. Als kleinster medizinisch relevanter Unterschied wurde eine Standardabweichung angegeben.

Falls aus den 18 für den Dosisvergleich erforderlichen Pferden nicht ausreichend Patienten für den zweiten Studienteil rekrutiert werden könnten, sollte die Gesamtanzahl der teilnehmenden Probanden erhöht werden, bis die Mindestanzahl an Pferden den jeweiligen Versuchsteil beendet hat.

3.1.2.2 Besitzeraufklärung

Die Besitzer wurden vorab ausführlich mündlich über den genauen Ablauf der Studie sowie über das Risiko des Legens eines Venenverweilkatheters aufgeklärt. Sie mussten eine Einverständniserklärung unterschreiben, in der sie ihre Bereitschaft erklärten, ihr Pferd vollständig an der Studie teilnehmen zu lassen. Bei Eignung der Pferde für den zweiten Studienteil erklärten sich die Besitzer zudem damit einverstanden, die tägliche verblindete Gabe des Placebos bzw. Pergolids über einen Zeitraum von jeweils max. sechs Wochen durchzuführen. Sie mussten zudem einer Eintragung des Pferdes als „nicht zur Schlachtung bestimmt“ zustimmen, sofern dies im Equidenpass noch nicht erfolgt war. Außerdem wurden die Besitzer auf die Doping-Relevanz des Pergolids hingewiesen.

3.1.2.3 Ein- und Ausschlusskriterien

Die eigenen Untersuchungen fanden an Pferden und Ponys statt, für die keine Geschlechts- oder Rassekriterien festgelegt wurden. Als Einschlusskriterium wurde ein Mindestalter von 15 Jahren zu Versuchsbeginn festgelegt, welches mittels Equidenpass überprüft wurde. Um an der Therapiestudie teilnehmen zu können war es außerdem nötig, dass die Pferde mittels ACTH-Zehnminutenwert als *equivocal* oder *PPID likely* klassifiziert wurden und sie im Equidenpass als „nicht zur Schlachtung bestimmt“ eingetragen waren.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Ausgeschlossen wurden Tiere, die bereits den Dopaminagonisten Pergolid erhielten bzw. erhalten hatten, tragende Stuten sowie Pferde, die an schweren sonstigen Grunderkrankungen oder Schmerzen litten. Des Weiteren wurden Pferde mit Thrombosierung einer Vena jugularis externa nicht aufgenommen, da es erforderlich war, mehrmals einen Venenverweilkatheter zu legen. Falls relevante Auffälligkeiten bei der in der Voruntersuchung (Kap. 3.1.4) durchgeführten Blutuntersuchung auftraten, sollten die Pferde ebenfalls von der Studie ausgeschlossen werden.

3.1.3 Tierversuchsgenehmigung

Ein Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes für das geplante Vorhaben wurde am 14.09.2020 durch das Regierungspräsidium Gießen für max. 44 Pferde genehmigt (Aktenzeichen GI 18/13 Nr. G 56/2020). Um die statistisch ausreichenden Probandenanzahlen von 18 Individuen für den TRH-Dosisvergleich und 13 Individuen für die Therapiestudie zu erhalten, wurden für das Versuchsvorhaben mehr Tiere (24 Tiere für TRH-Dosisvergleich, 20 Tiere für Therapiestudie) beantragt. Der Versuch wurde dem Regierungspräsidium am 11.10.2022 als beendet gemeldet. Für beide Studienteile wurden insgesamt 18 Individuen verwendet.

3.1.4 Voruntersuchungen

Bevor eine Aufnahme der Pferde in die Studie erfolgte, wurde max. 14 Tage vor dem ersten TRH-Stimulationstest eine Voruntersuchung im Heimatstall durchgeführt. Diese beinhaltete zunächst eine ausführliche Anamnese sowie die Überprüfung des Mindestalters mittels Equidenpass. Anschließend wurde eine allgemeine klinische Untersuchung inklusive spezieller klinischer Untersuchungen der einzelnen Organsysteme sowie eine Prüfung auf Lahmheit im Schritt durchgeführt. Hierdurch sollten deutlich schmerzhafteste Prozesse oder schwerwiegende Erkrankungen ausgeschlossen werden. Als gering- bis mittelgradig bewertete Auffälligkeiten in der klinischen Untersuchung wurden deskriptiv dokumentiert. Des Weiteren wurden 11 ml

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

venöses Blut aus der Vena jugularis externa zur Blutuntersuchung (Hämatologie, klinische Chemie, Serum-Amyloid-A; Einzelparameter s. Tab. 24) entnommen, um entzündliche Prozesse oder Hinweise auf Organerkrankungen bei den Probanden auszuschließen. Zur Vorbereitung auf den ersten TRH-Test wurde das Körpergewicht der Pferde mittels Tierwaage (Proband 1) oder mittels Spiller Pferdemaßband bestimmt.

3.1.5 Klinische Untersuchungen und Scores

Vor Beginn jedes Tests wurden die Pferde erneut eingehend klinisch untersucht. Die Vitalparameter sowie Auffälligkeiten wurden dokumentiert und das aktuelle Körpergewicht bestimmt. Darüber hinaus wurde ein selbst entwickelter klinischer Score angewandt, der helfen sollte an PPID erkrankte Pferde zu erkennen und zu graduieren. Ergaben die klinischen Untersuchungen ein ungestörtes Allgemeinbefinden wurde mit der Durchführung des TRH-Tests (Kap. 3.1.6) begonnen. Nach abgeschlossenem TRH-Test wurden die Probanden erneut allgemein klinisch untersucht und die Vitalparameter dokumentiert.

Der klinische Score gliederte sich in drei thematische Abschnitte: PPID, Hufrehe und Adipositas (Anhang Kap. 8.1). Ziel war es zu untersuchen, inwieweit der Score vor und nach Therapie mit den Laborergebnissen korreliert und ob er zukünftig als ein Bestandteil der Frühdiagnostik der Erkrankung genutzt werden kann.

Der Score wurde bei allen Probanden beim initialen TRH-Test angewandt. Bei den in die Therapiestudie aufgenommenen Pferden wurde der Score erneut jeweils beim TRH-Test nach Gabe des Placebos bzw. Pergolids durchgeführt. Mittels des selbst erstellten Punktwertesystems wurden sowohl anamnestiche Fragen an den Besitzer bewertet als auch klinische Symptome beurteilt. Hervorgehoben sei, dass das Symptom „generalisierte Hypertrichose“ als pathognomonisch für die Diagnose „PPID“ angesehen wurde und nicht in den Score einging, da in diesem ausschließlich die subtileren möglichen Symptome bewertet wurden.

Zunächst wurde systematisch das Vorhandensein bestimmter Symptome erfragt. Diese wurden anschließend klinisch überprüft und jeweils der Grad der Ausprägung bestimmt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Es konnte zwischen nicht vorhanden (0 Punkte) oder einer geringgradigen (1 Punkt), mittelgradigen (2 Punkte) und hochgradigen (3 Punkte) Ausprägung gewählt werden. Da einige Symptome des Erkrankungsbildes schwer bzw. nicht zu graduieren sind, wurde bei diesen lediglich das Vorhandensein mit 1 Punkt und das Nichtvorhandensein mit 0 Punkten bewertet. Hierzu zählten z.B. Hyperhidrose, Durchtrittigkeit, neurologische Auffälligkeiten oder bei Stuten vermehrte Euterfüllung. Da letzteres Symptom geschlechtsspezifisch ist, ergab sich eine unterschiedliche maximal mögliche Gesamtpunktzahl zwischen männlichen (max. 62 Punkte) und weiblichen (max. 63 Punkte) Tieren. Für die Teilscores waren folgende Maximalpunktzahlen möglich:

„PPID“: 39 (Wallache) bzw. 40 (Stuten)

„Hufrehe“: 17

„Adipositas“: 6.

Außerdem wurden systematisch weitere Fragen an den Besitzer gestellt, wobei die Antworten ohne Wertung dokumentiert wurden und nicht direkt in das Score-System einfließen.

Da bei einigen Symptomen keine Veränderung der Ausprägung innerhalb des Studienzeitraums zu erwarten war oder sich diese auf den Vorbericht über mehrere Jahre bezogen, wurde zwischen fixen und flexiblen Variablen unterschieden. Während die flexiblen Variablen bei den TRH-Tests nach Placebo bzw. Pergolid erneut erfragt und bewertet wurden, wurden die fixen Variablen nur beim initialen Score bestimmt.

3.1.6 TRH-Stimulationstest

Um circadiane Einflüsse auszuschließen, wurden alle TRH-Tests bis spätestens 10 Uhr morgens begonnen. Der jeweilige Proband erhielt für mindestens 12 Stunden zuvor kein Kraftfutter und mindestens 2 Stunden zuvor kein Heu. Alle TRH-Tests wurden im Heimatstall der jeweiligen Probanden unter stets gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Hauptzielmessgröße war ACTH und als Nebenzielparameter wurde Insulin bestimmt. Zwischen dem ersten und zweiten TRH-Test lag eine Wash-out-Zeit von mind. 10 und max. 14 Tagen. Die Abfolge der TRH-Dosierungen wurde durch eine vorab erstellte

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Randomisierungsliste (Tab. 2) bestimmt. Für die TRH-Tests, die nach der Gabe des Placebos bzw. Pergolids durchgeführt wurden, wurde immer die TRH-Dosierung von 2 µg/kg KGW verwendet. Der Testablauf war stets identisch.

Tab. 2: Randomisierungsliste für die Reihenfolge der beiden TRH-Dosierungen (µg/kg KGW) beim Dosisvergleich

Probandennummer	Dosis beim 1. Test	Dosis beim 2. Test
1	0,5	2
2	0,5	2
3	2	0,5
4	2	0,5
5	0,5	2
6	2	0,5
7	0,5	2
8	2	0,5
9	2	0,5
10	0,5	2
11	0,5	2
12	2	0,5
13	0,5	2
14	2	0,5
15	2	0,5
16	0,5	2
17	0,5	2
18	2	0,5

3.1.6.1 Legen des Venenverweilkatheters

Nach Adspektion und Palpation beider Jugularvenen wurde auf einer Seite das entsprechende Hautareal im oberen Halsdrittel geschoren, gereinigt und desinfiziert und anschließend ein Venenverweilkatheter (WVI PU Soft Venenverweilkanüle 12G Länge 80 mm soft, Walter Veterinär-Instrumente e.K., Baruth/Mark) herzwärts in die Vena jugularis externa eingelegt. Dieser wurde mit einem nicht-resorbierbaren Faden an der Haut fixiert. An den Venenkatheter wurde ein zuvor mit heparinierter

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Natriumchloridlösung gespülter, kurzer Schlauch (Heidelberger Verlängerung 15 cm, M. Schilling GmbH, Medical Products, Gelnhausen) sowie ein Dreiwege-Hahn (acti-fine® 3-way stopcock, M. Schilling GmbH, Medical Products, Gelnhausen) befestigt, um die Probenentnahmen zu erleichtern. Die Verlängerung wurde ebenfalls mit einem nicht-resorbierbaren Faden an der Haut fixiert. Anschließend wurde der Venenverweilkatheter über den Dreiwege-Hahn mit 10 ml heparinierter Natriumchloridlösung (Verhältnis: 50 I.E. Heparin/ml 0,9%iger steriler Natriumchloridlösung; Isotonische Natriumchlorid-Lösung ad us. Vet. B. Braun Vet Care und Heparin-Natrium Braun 5000 I.E./ml Injektionslösung der Firma B. Braun Melsungen AG) gespült.

3.1.6.2 Basale Blutprobenentnahme

Nach dem Schieben des Venenverweilkatheters wurde mit der ersten Blutentnahme (basal) mindestens 15 Minuten gewartet, um mögliche Stresseffekte auf die Blutwerte durch die vorangegangenen Manipulationen zu vermindern. Zunächst wurden 6 ml Blut mit einer Spritze über den Dreiwege-Hahn aspiriert und verworfen. Die anschließende Probengewinnung erfolgte mittels Luer-System über einen Multi-Adapter (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht) in eine 9 ml Serum-Monovette (S-Monovette® 9 ml Z, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht) für die Messung des basalen Insulins sowie in eine 9 ml EDTA-Monovette (S-Monovette® 9 ml K3E, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht) für die Messung des basalen ACTHs. Danach wurde die Kombination aus Dreiwege-Hahn, Heidelberger Verlängerung und Venenverweilkatheter mit 10 ml heparinierter Natriumchloridlösung zur Gewährleistung der weiteren Durchgängigkeit gespült.

3.1.6.3 TRH-Injektion und weiterer Ablauf

Im Anschluss erfolgte die intravenöse TRH-Gabe (TRH Ferring 0,2 mg/ml Injektionslösung, Ferring Arzneimittel GmbH, Kiel). Beim TRH-Dosisvergleich wurden entweder 0,5 µg/kg KGW oder 2 µg/kg KGW entsprechend der randomisierten Reihenfolge verabreicht. Die errechnete Menge TRH wurde immer mit isotoner

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Natriumchloridlösung auf ein Gesamtinjektionsvolumen von 10 ml aufgefüllt. Nach der TRH-Injektion wurde der Venenzugang erneut mit 10 ml heparinierter Natriumchloridlösung gespült. Im Folgenden wurde, wie in Abb. 3 dargestellt, 5, 10, 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach der TRH-Injektion jeweils eine Blutprobe mittels Multi-Adapter in eine 9 ml EDTA-Monovette für die Messungen des ACTHs entnommen. Vor jeder Blutentnahme wurden jeweils 6 ml Blut aspiriert und verworfen und nach jeder Blutentnahme mit 10 ml heparinierter Natriumchloridlösung gespült. In den ersten 15 Minuten nach TRH-Injektion standen die Pferde unter ständiger Beobachtung, um eventuell auftretende unerwünschte Wirkungen (Kap. 3.1.6.5) zu erfassen. Im Anschluss an die Blutentnahme nach 30 Minuten wurde den Pferden Heu angeboten. Nach der letzten Blutentnahme wurde der Venenverweilkatheter gezogen und der Proband allgemein klinisch untersucht.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

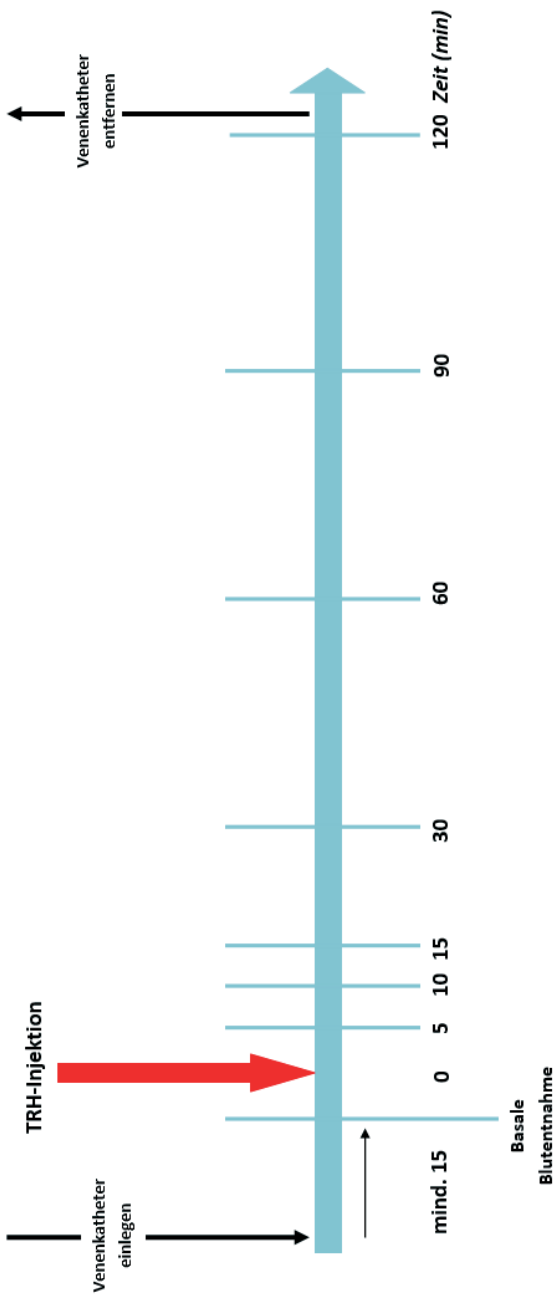


Abb. 3: TRH-Stimulationstest mit acht Blutentnahmen (senkrechte blaue Striche) im zeitlichen Verlauf

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1.6.4 Blutprobenaufbereitung

Die Blutröhrchen wurden zunächst in einer Styroporbox stehend aufbewahrt bzw. transportiert und innerhalb der nächsten 4 Stunden im klinikeigenen Labor 10 Minuten bei 2000 g (RCF, relative centrifugal force) in einer Rotina 35 Hettich Zentrifuge (Durchmesser 35 cm) zentrifugiert. Das Plasma bzw. Serum wurde anschließend in neutrale Probenröhrchen überführt. Diese wurden, verpackt in Schutzröhrchen, bei -20 °C tiefgefroren und mittels Kurier zu Biocontrol (Bioscientia Healthcare GmbH, Institut für Medizinische Diagnostik GmbH, Ingelheim) gesendet. Von jeder Probe wurde ein zweites Röhrchen als Rückstellprobe behalten und in der Klinik bei -20 °C in einem Tiefgefrierschrank asserviert.

3.1.6.5 Unerwünschte TRH-Wirkungen

Die Pferde standen im Anschluss an die TRH-Injektionen für die nächsten 15 Minuten unter besonders intensiver Beobachtung, um eventuell auftretende unerwünschte Wirkungen wie z.B. Kauen, Flehmen, Lippenlecken, Husten, Gähnen oder auch andere Auffälligkeiten zu erfassen. Die Symptome wurden entsprechend der Dauer ihres Auftretens pro Minute systematisch dokumentiert. Hierfür wurde das durch die eigene Arbeitsgruppe entwickelte Score-System verwendet (Stallenberger 2020). Innerhalb der ersten 15 Minuten wurde pro Symptom und pro Zeitraum von jeweils einer Minute einer der folgenden Score-Punkte verteilt und die Punkte zu einem Gesamtscore addiert:

0: Symptom tritt nicht auf

1: Kurzzeitiges Auftreten: pro Minute insgesamt max. 10 Sekunden

2: Gelegentliches Auftreten: pro Minute insgesamt zwischen 10 und 40 Sekunden

3: Überwiegendes Auftreten: pro Minute insgesamt mind. 40 Sekunden

Traten sonstige Symptome auf, wurden diese allein deskriptiv dokumentiert und gingen somit nicht in den Score ein.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1.7 Laboruntersuchungen

Die Bestimmung von ACTH und Insulin erfolgte durch das Labor Biocontrol, Bioscientia Healthcare GmbH, Ingelheim. Die Messungen erfolgten mittels Immunoassays auf Grundlage von Chemilumineszenzverfahren und werden im Folgenden näher erläutert. Immunoassays sind biochemische Tests, die mittels Bindung von Antikörpern und Antigenen zum Nachweis spezifischer Substanzen in einer Probe genutzt werden. Die folgenden Informationen wurden aus Testanleitungen und Produkthandbüchern des Herstellers (Siemens Healthineers) entnommen sowie durch den direkten Kontakt mit Mitarbeitern von Siemens und Biocontrol übermittelt. Die Kennzahlen sind den Systembeschreibungen der Hersteller entnommen und wurden durch den Hersteller unter Verwendung humaner Proben bestimmt. Die Assays wurden durch Biocontrol für Pferde validiert.

3.1.7.1 ACTH

Die Messung der ACTH-Konzentrationen erfolgte aus EDTA-Plasma mit dem Immulite® 2000 XPi Immunoassay System (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen). Es wurde der Immulite ACTH Chemilumineszenz Enzym Immunoassay (CLEIA) benutzt, ein Festphasen-, sequenzieller Zweischritt-, Chemilumineszenz- und immunometrischer Assay. Für die Messungen verwendet das System als Festphase mit monoklonalen ACTH-Maus-Antikörpern beschichtete Polystyrolkugeln. Es wird eine Kugel zusammen mit der Probe in das Reaktionsgefäß gegeben und mit einem Alkaliphosphatase-markierten Reagenz (zweiter Anti-ACTH-Antikörper) inkubiert. Es entsteht ein an die Kugel gebundener Antikörper-Sandwich-Komplex mit dem zu untersuchenden ACTH und dem alkalischen Phosphatasekonjugat. Anschließend wird das Reaktionsgefäß bei hohen Drehzahlen um die eigene vertikale Achse gedreht. Durch diese sogenannte „Waschung“ wird ungebundene Reaktionsmischung von der Kugel entfernt. Die nicht gebundene Flüssigkeit wird über eine integrierte, koaxiale Abfallkammer abgeleitet. Anschließend folgt die Zugabe von luminogenem Dioxetansubstrat. Dieses wird durch das an die Kugel gebundene alkalische Phosphatasekonjugat in ein

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Anionenzwischenprodukt dephosphoryliert, was beim Zerfall zur Aussendung eines Photons führt. Die entstehende Lichtmenge ist bei diesem Sandwich-Assay direkt proportional zur ACTH-Menge in der Probe. Die Lichtemission wird durch einen Fotoverstärker erfasst und im Gerät in die ACTH-Konzentration umgerechnet.

Kennzahlen Immulite® 2000 XPI ACTH

- Analytischer Messbereich: 2 bis 1000 pg/ml (Biocontrol), bis 1250 pg/ml (Herstellangaben Siemens), bei höheren Werten erfolgte eine Verdünnung der Probe mit Immulite 2000-Verdünnungspuffer
- Analytische Sensitivität: 5 pg/ml
- Intra-Assay Variationskoeffizient: 1,8 bis 2,4 % (Biocontrol)
- High-Dose-Hook-Effekt: keiner bis 1 500 000 pg/ml
- Testkits Artikelnummer: L2KAC2

Weitere Angaben von dem Hersteller des Analysegerätes zur Intraassay- sowie Interassay-Präzision, zur Spezifität und Interferenzen sind im Anhang im Kapitel 8.2.1 aufgeführt.

3.1.7.2 Insulin

Die Messung der Insulinkonzentrationen erfolgte aus Serum mit dem ADVIA Centaur® XP Immunoassay System (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen). Es wurden Centaur Insulin Kits verwendet. Das Messverfahren ist ein Sandwich-Immunoassay auf Basis direkter Chemilumineszenz, bei dem konstante Mengen zweier verschiedener monoklonaler Antikörper verwendet werden. Die Serumprobe wird zuerst mit dem ersten monoklonalen Antikörper, einem Maus-Anti-Insulin-Antikörper, der mit Acridiniumester (AE) markiert ist, im Lite-Reagenz bei 37 °C für 5 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgt eine 2,5-minütige Inkubation der Probe bei der gleichen Temperatur mit dem zweiten monoklonalen Antikörper, einem kovalent an paramagnetische Partikel (PMP) gebundenen Maus-Anti-Insulin-Antikörper in der Festphase (Solid-Phase). Es folgen mehrere Wasch- und Aufreinigungsschritte, nachdem

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

durch Anlegen eines Magnetfeldes die an die PMP gebundenen Immunkomplexe an der Küvettenwand fixiert wurden. Danach werden ungebundene Proben- und Reagenzienbestandteile durch Waschungen aus der Küvette entfernt. Laut Hersteller erfolgt die Zugabe einer Säure und Base, woraufhin die Chemilumineszenzreaktion ausgelöst wird. Die detektierten relativen Lichteinheiten korrelieren direkt mit der Insulinkonzentration in der Probe.

Kennzahlen ADVIA Centaur® XP Insulin

- Analytischer Messbereich: 1 bis 100 $\mu\text{U/ml}$ (Biocontrol); 0,5 bis 300 mU/l (Herstellerangaben Siemens), bei höheren Werten wird eine Verdünnung (mit ADVIA Centaur IRI Diluent Verdünnungslösung) durchgeführt
- Intra-assay Variationskoeffizient: 1,4 bis 3,0 % (Biocontrol)
- High-Dose-Hook-Effekt: Proben mit Werten bis 3000 mU/l werden mit > 300 mU/l angegeben
- Produktname Testkits: REF 02230141

Weitere Angaben von dem Hersteller des Analysegerätes zur Spezifität, Präzision und Interferenzen sind im Anhang im Kapitel 8.2.2 aufgeführt.

3.1.8 Statistische Auswertungen

Die statistische Planung erfolgte durch Herrn Dr. rer. nat. Dipl.-Math. Klaus Failing und die statistische Auswertung mithilfe von Frau Dr. sc. agr. Kathrin Büttner und ihrer Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Für die Planung wurde das Statistikprogrammpaket BMDP/Dynamic, Release 8.1 und für die statistische Auswertung das Statistikprogramm SAS 9.4 benutzt.

Die Abbildungen im Text wurden von der Autorin mit dem Programm Excel des Programms Microsoft Office Professional Plus 2019 angefertigt bzw. stammen aus den

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Statistikdateien des Programms SAS 9.4 und wurden zum Teil mit dem Programm Paint bearbeitet.

Es wurden alle Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Die Daten werden im Ergebnisteil, soweit nicht anders aufgeführt als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) bzw. als Median (1./3. Quartil) angegeben.

3.1.8.1 Statistik zum klinischen Score

Die Gesamtscores, die drei Teilscores „PPID“, „Hufrehe“ und „Adipositas“ sowie die Einzelsymptomscores wurden auf Korrelationen mit den ACTH-Basal- und Zehnminutenwerten am initialen Testtag mit 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TRH überprüft. Hierfür wurde der p-Wert und der jeweilige Spearman-Rangkorrelationskoeffizient bestimmt.

3.1.8.2 Statistik zum TRH-Dosisvergleich

Bei der statistischen Auswertung wurde das intraindividuelle Cross-over-Design berücksichtigt. Zunächst wurden die Flächen unter den Kurven (AUCs) für den Parameter ACTH vom Zeitpunkt 0 Minuten (Basalwert) bis 120 Minuten nach TRH-Injektion berechnet. Zudem wurden die ACTH-Werte zu den Zeitpunkten 0, 10 und 30 Minuten sowie die Maximalwerte und der Zeitpunkt des Auftretens des Maximums auf signifikante Unterschiede zwischen den beiden TRH-Dosierungen geprüft.

Die Prüfung auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test ergab, dass die AUCs und Maximalwerte schief verteilt waren, weshalb diese Werte vor Anwendung der statistischen Tests logarithmiert wurden. Bei den Dreißigminutenwerten wurde aufgrund fehlender Normalverteilung zusätzlich ein nicht-parametrisches Verfahren mittels Mann-Whitney-U-Test für die einzelnen Effekte angewandt.

Zur statistischen Prüfung wurde ein linear gemischtes Modell mit den drei fixen Effekten „Sequenz“ (0,5/2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ oder 2/0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), „Periode“ (erste oder zweite TRH-Gabe) sowie „TRH-Dosis“ (0,5 oder 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) und dem Zufallseffekt „Individuum“ gewählt. Bei der Sequenz wurde überprüft, ob es einen Übertragungseffekt gibt, indem die

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Probanden, die die Dosierung in der Reihenfolge erst 0,5 und dann 2 µg/kg erhielten, mit denen verglichen wurden, die zuerst 2 und als zweites 0,5 µg/kg erhielten. Bei dem Periodeneffekt wurde die erste mit der zweiten TRH-Gabe verglichen, um zu überprüfen, ob die Wash-out-Phase lang genug gewählt wurde. Bei dem dritten Effekt, der TRH-Dosis, wurden die Ergebnisse der Dosierungen 0,5 µg/kg und 2 µg/kg miteinander verglichen.

3.1.8.3 Statistik zur Therapiestudie

Nach Placebo- und Verumgabe wurden für die statistische Auswertung die ACTH-AUCs von 0 bis 120 Minuten nach TRH-Injektion berechnet sowie die ACTH-Werte zum Zeitpunkt 0, 10 und 30 Minuten, die Maximalwerte und der Zeitpunkt ihres Auftretens verglichen. Des Weiteren wurden die Ergebnisse des initialen TRH-Stimulationstests mit jenen nach Placebo- bzw. Pergolidgabe (TRH-Dosierung immer 2 µg/kg) auf Unterschiede geprüft.

Vorab wurden die Daten mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Alle Werte mussten für die weiteren Berechnungen log₁₀ transformiert werden. Konnte mittels Logarithmierung eine (annähernde) Normalverteilung erreicht werden, wurden anschließend t-Tests für gepaarte Stichproben angewandt.

Da die basalen ACTH-Werte nach Placebo und Therapie trotz Logarithmierens keine Normalverteilung aufwiesen, wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test durchgeführt.

3.1.8.4 Statistik zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen nach TRH

Die fünf Symptome Kauen, Flehmen, Lippenlecken, Husten und Gähnen sind als unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) des TRHs bekannt und wurden bei allen Probanden mittels Score-System in den ersten 15 Minuten nach TRH-Gabe dokumentiert. Da die Scores nicht normalverteilt waren, wurden nichtparametrische Verfahren verwendet. Mithilfe des exakten Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

gepaarte Beobachtungen ($n = 18$) wurde berechnet, ob es einen statistisch signifikanten Unterschied gab zwischen den Scores nach 0,5 bzw. 2,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TRH. Die Reihenfolge der Dosierungen wurde hierbei ignoriert. Des Weiteren wurde ein statistischer Vergleich der Scores zwischen dem initialen TRH-Test sowie den TRH-Tests nach Placebo- bzw. Pergolidgabe ($n = 13$) durchgeführt. Hierfür wurde der Friedman-Test angewandt.

3.2 ERGEBNISSE

Die klinische Studie wurde im Zeitraum vom 18.12.2020 bis zum 11.06.2022 durchgeführt. Es haben 18 Probanden daran teilgenommen und diese wie vorgesehen beendet. Alle Pferde und Ponys durchliefen den ersten Studienteil (TRH-Dosisvergleich) und 13 davon nahmen im direkten Anschluss am zweiten Studienteil (Therapiestudie) teil. Bei allen Probanden wurden beide Studienteile in den jeweiligen Heimatställen und somit in der von den Pferden und Ponys gewohnten Umgebung durchgeführt.

3.2.1 Probandenübersicht

Insgesamt nahmen 18 Pferde und Ponys unterschiedlicher Rassen an der Studie teil (Tab. 3). Es handelte sich um 10 Wallache und 8 Stuten, die zum Zeitpunkt des ersten Testtages zwischen 15 und 29 Jahren ($19,9 \pm 4,1$ Jahre) alt waren. Das Körpergewicht betrug $525,6 \pm 89,2$ kg mit einer Spannweite von 330 bis 660 kg.

Zu den Probanden zählte ein Versuchspferd der Klinik für Pferde, Innere Medizin der JLU Gießen (Proband 1). Alle weiteren Probanden wurden von privaten Eigentümern nach eingehender Aufklärung für die Studie zur Verfügung gestellt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tab. 3: Probandenübersicht

Nr.	Rasse	Alter	Geschlecht	Therapiestudie
1	Warmblut	18	m	Ja
2	Pony	21	w	Ja
3	PRE (Pura Raza Español)	16	m	Ja
4	Tinker	22	w	Ja
5	Freiberger	21	m	Nein
6	Welsh Cob-Mix	19	m	Nein
7	Pony	21	w	Ja
8	Schweres Warmblut	20	m	Ja
9	Haflinger	22	w	Nein
10	Halbblut	16	w	Ja
11	Quarter-Mix	17	w	Nein
12	Appaloosa-Mix	15	m	Ja
13	Islandpferd-Mix	15	w	Ja
14	Paint x Deutsches Reitpony	15	m	Ja
15	Warmblut	23	m	Nein
16	Warmblut	21	w	Ja
17	KWPN (Holländisches Warmblut)	29	m	Ja
18	Arabisches Vollblut	28	m	Ja

m: männlich, w: weiblich

3.2.1.1 Voruntersuchungen

Die klinischen und labordiagnostischen Voruntersuchungen wurden im Zeitraum von maximal 14 Tagen vor dem jeweiligen ersten Testtag durchgeführt. Es wurden insgesamt 20 Pferde voruntersucht, von denen zwei nicht in die Studie aufgenommen wurden. Zum einen handelte es sich dabei um eine 19-jährige Warmblutschimmelstute, die klinisch mit einem schlechten Ernährungszustand auffiel und in der Blutuntersuchung eine mittelgradige Hypalbuminämie von 21,3 g/l sowie einen erhöhten Hämatokrit von 0,45 l/l zeigte. Da von einer schweren Erkrankung neben einer möglichen PPID ausgegangen werden musste, konnte das Pferd nicht an der Studie teilnehmen. Bei dem zweiten Pferd handelte es sich um eine 23-jährige Islandpferd Stute. Eine erste Voruntersuchung wurde am 20.01.2022 durchgeführt und verlief sowohl klinisch als auch labordiagnostisch ohne besonderen Befund. Allerdings wurde kurz danach eine mittelgradige ulzerative Gastritis festgestellt, die mit verminderter Futtermittelaufnahme

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

einher ging. Es wurde daher zunächst eine Therapie durchgeführt, worunter die Stute wieder symptomfrei wurde. Am 03.03.2022 wurde die Stute erneut voruntersucht ohne Auffälligkeiten zu zeigen. Am 05.03.2022, dem Abend vor dem geplanten ersten Test, zeigte das Pferd aber akute Koliksymptome, sodass auf die Teilnahme an der Studie verzichtet wurde.

3.2.1.1.1 Vorbericht

Im Rahmen der Voruntersuchung wurden den Besitzern Fragen zu bekannten Vorerkrankungen im Allgemeinen und speziell im Hinblick auf Symptome einer PPID gestellt. Von fünf Probanden (Proband 7, 10, 12, 15, 16) war vorberichtlich eine chronisch obstruktive Bronchitis bekannt. Orthopädische Probleme von Gelenken und Sehnen wurden bei vier Probanden (Proband 1, 4, 6, 18) beschrieben. Zwei Pferde (Proband 4 und 12) wiesen einen einseitigen Anophthalmus aufgrund einer vorangegangenen chirurgischen Exenteratio oculi auf. Bei Proband 4 wurde der linke Augapfel infolge eines Exophthalmus und sekundären Glaukoms aufgrund einer retrobulbären, tumorösen Umfangsvermehrung im Jahr 2019 entfernt. Bei Proband 12 wurde der Bulbus oculi 2020 infolge einer Equinen rezidivierenden Uveitis mit schlechtem Ansprechen auf medikamentöse Therapien entfernt. Bei Proband 16 war eine mittelgradige Mitralklappeninsuffizienz und eine geringgradige Aorteninsuffizienz bekannt und bei Proband 18 wurden maligne Melanome vermutet. Vorberichtlich chronische oder rezidivierende Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes wurden bei einzelnen Probanden beschrieben. Während Proband 2 etwa alle drei Monate milde, rezidivierende Koliksymptome zeigte, waren bei Proband 16 eine chronisch rezidivierende Blinddarmverstopfung und bei den Probanden 17 und 18 Zahnprobleme aufgrund von Fehlstellungen bzw. eines senilen Gebisses bekannt. Kotwasserprobleme gaben die Besitzer der Probanden 5 und 16 an. Zudem litten einzelne Probanden unter wiederkehrenden Hauterkrankungen. Ein Sommerekzem war bei Proband 3 und 15 bekannt. Hingegen zeigte Proband 5 eine jährlich wiederkehrende Dermatitis der distalen Gliedmaßen aufgrund von Milben und Proband 10 einmal jährlich wiederkehrende Hautpilzinfektionen.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Von für die PPID charakteristischen Symptomen wie Hypertrichose oder Fellwechselstörungen berichteten 11 Besitzer. Auffälligkeiten des Haarkleids wurden ausführlich erfragt, klinisch untersucht und beschrieben (Tab. 4). Bei den Probanden 2, 6 und 11 war zudem jeweils ein Hufreheschub bekannt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tab. 4: Auffälligkeiten des Haarkleids sowie Fellwechselstörungen der 18 Probanden

Proband	Veränderungen des Haarkleids und Fellwechselstörungen
1	Nein
2	Nein
3	Regionale Hypertrichose: an seitlichem Bauch und Lumbalregion etwas längere, weiche, teils gesträubte Haare, an Kruppe „stehen Haare ab“; Fellfarbe variiert laut Besitzerin ca. alle zwei Jahre (dunkle Stichelhaare); leicht verzögerter Fellwechsel an Bauch, Brust und palmar an Vorderbeinen seit über drei Jahren
4	Generalisierte Hypertrichose: seit dem aktuellen Winter langes, dichtes Fell am ganzen Körper, mehr Behang; seit einem Jahr deutlich verzögerter Fellwechsel
5	Einzelne borstige, längere Haare an Hals und Schulter; seit einem Jahr fallen diese Haare im Fellwechsel leicht verzögert aus; Teilschur
6	Seit aktuellem Winter insgesamt dickeres Fell, keine längeren Haare
7	Generalisierte Hypertrichose: dickes, längeres Fell im Winter (Körper, Rückseite Beine, Brust); deutlich verzögerter Fellwechsel seit ca. einem Jahr v.a. an Hals, Brust, Ellenbogen
8	Nein
9	Nein
10	Nein
11	Leicht lockiges Fell im Schulterbereich
12	Nein
13	Deutlich verzögerter Fellwechsels seit ca. einem Jahr (Hals, Unterkiefer)
14	Nein
15	Deutlich verzögerter Fellwechsel an Schulter, Bauch und Flanke seit ca. drei bis vier Jahren
16	Fokal sehr leicht längere Haare (caudal der Schulter, hinter Ellenbogen in Sattelturlage)
17	Regionale Hypertrichose: an Brust, Schulter, Ellenbogen, Sattellage und langer Sitzbeinmuskulatur längere Haare; leicht verzögerter Fellwechsel seit ca. drei bis vier Jahren
18	Generalisierte Hypertrichose: sehr dichtes Fell mit größeren Wirbeln; seit ca. zwei bis drei Jahren generalisiert deutlich verzögerter Fellwechsel, seit einem Jahr fokal teils ausbleibender Fellwechsel (Brust, Bauch)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.2.1.1.2 Klinische Voruntersuchungen

Von den 18 Probanden zeigten lediglich vier (Proband 5, 6, 11 und 13) keine Auffälligkeiten in der klinischen Untersuchung. Die Befunde sind detailliert im Kap. 8.3.1 im Anhang beschrieben. Sie wurden als nicht relevant für die geplanten Studien eingeschätzt, sodass die untersuchten Probanden daran teilnahmen.

3.2.1.1.3 Labordiagnostische Voruntersuchungen

Die Blutuntersuchungen (Hämatologie, Routineparameter der klinischen Chemie sowie SAA, Anhang Tab. 24) waren bei 13 der 18 Probanden unauffällig. Fünf Pferde zeigten geringgradige Abweichungen (Anhang Kap. 8.3.2), die nach individueller Beurteilung bzw. Kontrollen als nicht relevant für die Studie bewertet wurden.

3.2.1.2 Klinische Untersuchungen und Scores an den Testtagen

Während des Studienzeitraums zeigten die Probanden bei den Untersuchungen klinische, teilweise von den in der Voruntersuchung erhobenen Befunden abweichende bzw. darüber hinaus gehende Auffälligkeiten, wie z.B. vergrößerte Mandibularlymphknoten, Nasen- oder Augenausfluss, Husten, verschärfte Lungenauskultation, nasaler Stridor, regelmäßige Herzrhythmie, Kotwasser oder breiigen Kotabsatz (Anhang Tab. 26). Die Befunde wurden nie als so erheblich gewertet, dass eine Therapie oder ein Studienausschluss als notwendig erachtet wurde. Alle einmal eingeschlossenen Probanden beendeten den jeweiligen Studienteil planmäßig.

Das selbst entwickelte klinische Score-System (Anhang Kap. 8.1) wurde bei allen 18 Probanden einmal initial im Rahmen des TRH-Dosisvergleichs durchgeführt. Die individuellen klinischen Scores sind in Tab. 5 dargestellt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tab. 5: Initiale klinische Scores der 18 Probanden, aufsteigend sortiert anhand ihrer Gesamtscores

Proband Nr.	Gesamt-score	PPID-Score	Hufrehe-Score	Adipositas-Score
1*	3	3	0	0
14*	4	2	0	2
10*	8	5	0	3
12*	8	3	3	2
13*	8	6	0	2
16*	8	8	0	0
15	9	8	1	0
2*	10	3	4	3
8*	10	6	0	4
9	10	5	1	4
17*	13	12	1	0
5	14	9	2	3
3*	16	10	2	4
6	17	8	4	5
7*#	17	13	0	4
11	17	8	5	4
18*#	21	19	1	1
4*#	22	17	1	4
MW	11,9	8,1	1,4	2,5
SD	5,3	4,6	1,6	1,6
Median	10	8	1	3
Minimum	3	2	0	0
Maximum	22	19	5	5

*Teilnahme an Therapiestudie, #generalisierte Hypertrichose

Zwischen den initialen ACTH-Basalwerten und den Scorepunkten wurden schwach positive Korrelationen zwischen „Mattigkeit Ausprägung“ ($r_s = 0,61$, $p = 0,007$) und „Mattigkeit Dauer“ ($r_s = 0,60$, $p = 0,009$) festgestellt. Bei den weiteren Gesamt-, Teil- und Einzelsymptomscores wurden statistisch keine Korrelationen mit den ACTH-Basalwerten festgestellt. Ebenso ergaben sich zwischen den initialen ACTH-Zehnminutenwerten und den klinischen Scores keine statistisch relevanten Korrelationen.

Bei den 13 Probanden, die auch an der Therapiestudie teilnahmen, wurden die Scores zudem nach Placebo und nach Pergolid erfasst. Die durchschnittlich erreichten

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Punktzahlen der klinischen Scores sind in Tab. 6 dargestellt. Die Gesamtscores lagen nach Pergolid etwas höher als initial und nach Placebo, was durch die ebenfalls höher liegenden Hufrehe-Scores nach Therapie bedingt war. Vier Probanden (Proband 2, 3, 7 und 8) zeigten zu diesem Zeitpunkt einen höheren Hufrehe-Score als nach Placebo, aufgrund einer erhöhten Scorepunktzahl beim Symptom „Wendeschmerz“ oder „Trachtenfußung“. Keines der Pferde zeigte weitere Hufrehesymptome.

Tab. 6: Klinische Scores (Mittelwert \pm Standardabweichung) der 13 Probanden der Therapiestudie

	Gesamtscore	PPID-Score	Hufrehe-Score	Adipositas-Score
Initial	11,4 \pm 5,8	8,2 \pm 5,4	0,9 \pm 1,3	2,2 \pm 1,5
Nach Placebo	11,5 \pm 5,1	8,2 \pm 5,2	1,2 \pm 1,2	2,1 \pm 1,4
Nach Pergolid	11,9 \pm 5,8	8,2 \pm 5,3	1,5 \pm 1,4	2,2 \pm 1,5

Aufgrund der offensichtlichen Ähnlichkeit der zu den drei Zeitpunkten erhobenen Scorewerte wurden hierzu keine statistischen Berechnungen durchgeführt. Daher erfolgt auch keine Ergebnisdarstellung im Einzelnen.

3.2.1.3 Einteilung der Probanden hinsichtlich ihres PPID-Status

Die ACTH-Basalwerte lagen bei allen Probanden initial zwischen 6 und 35 pg/ml, sodass sie nach den Empfehlungen der EEG nicht als *PPID likely* anzusehen waren (Hart et al. 2023). In Tab. 7 wurden die 18 Probanden auf Grundlage ihrer initialen ACTH-Zehnminutenwerte nach 2 μ g/kg TRH in aufsteigender Reihenfolge sortiert. Die zwei horizontalen Linien in der Tabelle unterteilen die Probanden anhand ihrer ACTH-Zehnminutenwerte in die von der EEG (Hart et al. 2023) definierten drei Gruppen *PPID unlikely* (< 100 pg/ml), *Interpretive Zone* (100-200 pg/ml) und *PPID likely* (> 200 pg/ml). Hinsichtlich des Symptoms Hypertrichose waren fünf Probanden (3 generalisiert und 2 regional) auffällig. Sie wiesen ACTH-Zehnminutenwerte von mindestens 237 pg/ml nach TRH-Stimulation auf und galten somit auch labordiagnostisch als *PPID likely*. Auf der

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

anderen Seite gab es fünf Probanden, die ACTH-Zehnminutenwerte im positiven Bereich aufwiesen, ohne dass sie eine Hypertrichose zeigten. Von den insgesamt zehn Pferden und Ponys, die anhand ihrer ACTH-Zehnminutenwerte in die *PPID likely* Kategorie fielen, zeigten lediglich fünf Probanden entsprechende ACTH-Dreißigminutenwerte (> 90 pg/ml). Interessanterweise gehörte ein Pura Raza Español Wallach mit regionaler Hypertrichose nicht dazu.

Tab. 7: Einteilung der Probanden hinsichtlich ihres PPID-Status, aufsteigend sortiert anhand der ACTH-Zehnminutenwerte nach 2 µg/kg TRH

Nr.	Rasse	Alter (Jahre)	Hypertrichose	Gesamtscore	ACTH 0 min	ACTH 10 min	ACTH 30 min
15	Warmblut	23	Nein	9	6	55	23
9	Haflinger	22	Nein	10	22	86	40
6	Welsh Cob-Mix	19	Nein	17	27	90	56
11	Quarter-Mix	17	Nein	17	16	91	33
14	Paint x Dt Reitpony	15	Nein	4	17	125	27
1	Warmblut	18	Nein	3	15	171	37
16	Warmblut	21	Nein	8	23	174	49
5	Freiberger	21	Nein	14	30	187	79
3	Pura Raza Español	16	reg.	16	14	237	69
12	Appaloosa-Mix	15	Nein	8	17	246	39
18	Arabisches Vollblut	28	gen.	21	21	255	108
8	Schweres Warmblut	20	Nein	10	15	265	81
13	Islandpferd-Mix	15	Nein	8	20	273	50
10	Halbblut	16	Nein	8	15	287	58
4	Tinker	22	gen.	22	35	384	229
7	Pony	21	gen.	17	24	447	148
17	Warmblut	29	reg.	13	14	527	101
2	Pony	21	Nein	10	24	1170	263

gen.: generalisiert, reg.: regional

3.2.2 TRH-Dosisvergleich

Im Folgenden werden die Ergebnisse des TRH-Dosisvergleichs (0,5 µg/kg versus 2 µg/kg an Tag 1 und Tag 10-14) bei allen 18 Probanden dargestellt. Die 36 Tests wurden zwischen dem 1. Dezember und 1. Mai in den Jahren 2020, 2021 und 2022 durchgeführt. Die Wash-out-Zeit lag bei $12,5 \pm 1,4$ Tagen (10-14 Tage).

Neben den ACTH-AUCs von 0 bis 120 Minuten wurden die ACTH-Werte zu den Zeitpunkten 0, 10 und 30 Minuten nach TRH-Gabe sowie die ACTH-Maximalwerte und der Zeitpunkt ihres Auftretens zwischen den beiden TRH-Dosierungen verglichen.

Die statistische Auswertung (Kap. 3.1.8.2) wurde unter Berücksichtigung des Cross-over-Studiendesigns durchgeführt. Es wurde ein linear gemischtes Modell mit den drei fixen Effekten „Sequenz“ (0,5/2 µg/kg oder 2/0,5 µg/kg), „Reihenfolge“ (erste oder zweite TRH-Gabe) sowie „TRH-Dosis“ (0,5 oder 2 µg/kg) und dem Zufallseffekt „Individuum“ gewählt.

Keine Messgröße zeigte signifikante Unterschiede hinsichtlich der Sequenz und Reihenfolge. Die ACTH-AUCs sowie die ACTH-Basal-, Zehnminuten- und Maximalwerte zeigten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden TRH-Dosierungen. Allerdings wurden bei den Dreißigminutenwerten signifikant ($p = 0,0005$) niedrigere ACTH-Konzentrationen bei 0,5 µg/kg TRH im Vergleich zur „normalen“ Dosis von 2 µg/kg TRH festgestellt. Die jeweiligen Ergebnisse und p-Werte sind in den Folgekapiteln angegeben.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.2.2.1 ACTH-AUCs

Zunächst wurden die AUCs, also die Flächen unter den ACTH-Kurven im Zeitraum von 0 bis 120 Minuten nach TRH-Injektion berechnet. Da die Werte nicht normalverteilt waren, wurden sie vor der statistischen Auswertung logarithmiert. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,08$) zwischen den beiden TRH-Dosierungen:

$\log AUC_{ACTH} 0,5 \mu\text{g/kg TRH (n = 18): } 3,87 \pm 0,25 \text{ pg/ml} \times 120 \text{ min}$

$\log AUC_{ACTH} 2,0 \mu\text{g/kg TRH (n = 18): } 3,93 \pm 0,28 \text{ pg/ml} \times 120 \text{ min.}$

Zudem ergab sich kein signifikanter Sequenz- oder Reihenfolgeeffekt.

3.2.2.2 ACTH-Basalwerte

Die basalen ACTH-Werte waren annähernd normalverteilt. Es wurde kein signifikanter Unterschied ($p = 0,93$) zwischen den TRH-Tests mit den beiden Dosierungen festgestellt:

ACTH-Basalwert vor 0,5 $\mu\text{g/kg TRH (n = 18): } 19,56 \pm 4,42 \text{ pg/ml}$

ACTH-Basalwert vor 2,0 $\mu\text{g/kg TRH (n = 18): } 19,72 \pm 6,84 \text{ pg/ml.}$

Ebenso ergaben die Tests auf mögliche Einflüsse der Sequenz und Reihenfolge keine signifikanten Unterschiede.

Bei 14 der 18 Probanden lagen die Basalwerte vor beiden Tests zwischen 15 und 30 pg/ml (Abb. 4). Sie lagen damit im Graubereich (15-40 pg/ml, *equivocal*) der 2023 veröffentlichten Empfehlungen der EEG (Hart et al. 2023). Proband 3 und 17 wiesen bei beiden Tests Basalwerte von unter 15 pg/ml auf, womit sie in den negativen (*PPID unlikely*) Bereich fielen. Proband 4 zeigte am ersten Testtag einen ACTH-Wert im Graubereich (35 pg/ml) und am zweiten Testtag einen negativen Wert (11 pg/ml). Hingegen stellte es sich bei Proband 15 umgekehrt dar, bei dem am ersten Testtag ein negativer ACTH-Wert (6 pg/ml) und am zweiten Testtag mit 19 pg/ml ein Wert im *equivocal* Bereich festgestellt wurde. Es gab keine Probanden mit basalen ACTH-Werten über dem Cut-off-Wert von 40 pg/ml und somit keine Basalwerte, die im positiven bzw. *PPID likely* Bereich lagen.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

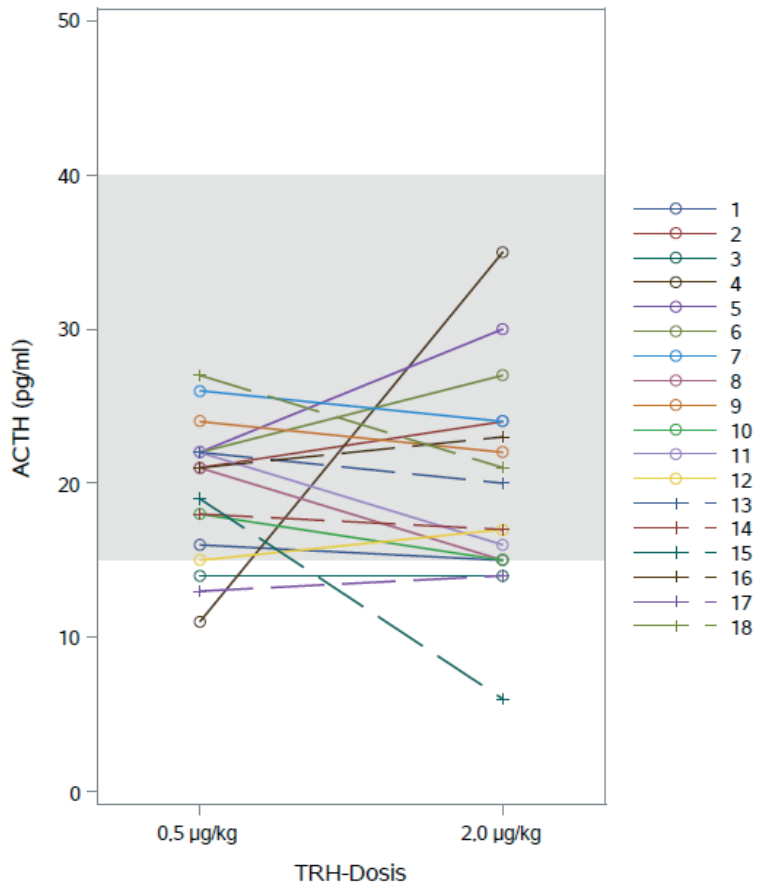


Abb. 4: ACTH-Basalwerte der 18 Probanden nach den beiden TRH-Dosierungen 0,5 µg/kg und 2,0 µg/kg; grau hinterlegt ist der laut Hart et al. (2023) als *Interpretive Zone* (Dezember bis Juni) im Hinblick auf eine PPID-Diagnose bezeichnete ACTH-Bereich

3.2.2.3 ACTH-Zehnminutenwerte

Die ACTH-Werte 10 Minuten nach den TRH-Gaben waren annähernd normalverteilt. Es wurde kein signifikanter Unterschied ($p = 0,28$) zwischen den beiden TRH-Dosierungen festgestellt. Ebenso hatten die Sequenz und Reihenfolge keinen signifikanten Effekt.

Die Spannbreite der ACTH-Werte 10 Minuten nach 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TRH lag zwischen 43 und 700 pg/ml ($241 \pm 196 \text{ pg}/\text{ml}$) und nach 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TRH zwischen 55 und 1170 pg/ml ($282 \pm 256 \text{ pg}/\text{ml}$). Sieben Pferde wiesen nach der niedrigeren TRH-Dosierung die höheren ACTH-Werte auf, während es bei den übrigen elf Pferden andersherum war. In Abb. 5 zeigt sich eine deutliche interindividuelle Variabilität.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

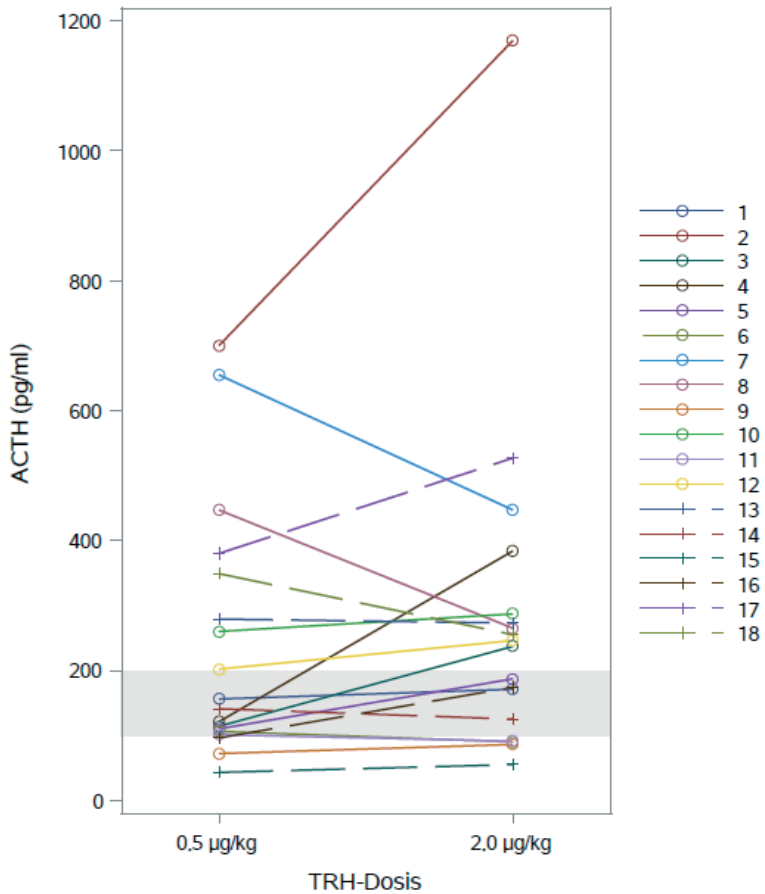


Abb. 5: ACTH-Zehnminutenwerte der 18 Probanden nach den beiden TRH-Dosierungen 0,5 µg/kg und 2,0 µg/kg; grau hinterlegt ist der laut Hart et al. (2023) als *Interpretive Zone* (Januar bis Juni) im Hinblick auf eine PPID-Diagnose bezeichnete ACTH-Bereich

Die Probanden wurden entsprechend der Cut-offs in den Empfehlungen der EEG (Hart et al. 2023) anhand ihrer ACTH-Werte 10 Minuten nach TRH-Injektion in eine der drei Kategorien „*PPID unlikely* bzw. *PPID negativ*“, „*Interpretive Zone / equivocal* bzw. *PPID im Graubereich*“ oder „*PPID likely* bzw. *PPID positiv*“ eingeteilt. Es blieben 13 Probanden

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

nach beiden Dosierungen in der gleichen Kategorie. Davon waren zwei Probanden *PPID unlikely* (Proband 9 und 15), drei Probanden lagen in der *Interpretive Zone* (Proband 1, 5 und 14) und acht Probanden waren *PPID likely* (Proband 2, 7, 8, 10, 12, 13, 17 und 18). Drei Probanden zeigten nach der Gabe von 2 µg/kg TRH eine so viel höhere ACTH-Antwort als nach 0,5 µg/kg, dass sie in die nächsthöhere Kategorie fielen. Proband 3 und 4 wechselten von der *Interpretive Zone* zu *PPID likely* und Proband 16 wechselte von *PPID unlikely* in die *Interpretive Zone*. Hingegen zeigten Proband 6 und 11, die mit 2 µg/kg TRH als *PPID unlikely* kategorisiert wurden, einen Wechsel in die *Interpretive Zone* mit der niedrigeren Dosierung.

3.2.2.4 ACTH-Dreißigminutenwerte

Die ACTH-Dreißigminutenwerte wiesen keine Normalverteilung auf. Daher wurde für diesen Zeitpunkt in der statistischen Auswertung das nicht-parametrische Verfahren des Mann-Whitney-U-Tests für die einzelnen Effekte angewandt. Die Sequenz und Reihenfolge besaßen keinen signifikanten Einfluss auf die Werte. Allerdings wurde ein hochsignifikanter Unterschied ($p = 0,0005$) zwischen den beiden Dosierungen zum Zeitpunkt 30 Minuten nach TRH-Injektion festgestellt (Tab. 8).

Proband 2 zeigte 30 Minuten nach 2 µg/kg TRH mit 263 pg/ml einen deutlich höheren ACTH-Wert als nach 0,5 µg/kg TRH – die Differenz betrug 110 pg/ml. Wurden die Werte dieses einen Probanden ausgeschlossen, ergab sich für die Dreißigminutenwerte des ACTHs eine annähernde Normalverteilung. Nach Entfernung des Datensatzes von Proband 2 wurde eine weitere statistische Berechnung mit dem linear gemischten Modell durchgeführt. Gleichwohl ergaben sich auch dann signifikant ($p = 0,02$) niedrigere Dreißigminutenwerte des ACTHs nach der niedrigeren TRH-Dosierung (Tab. 8).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tab. 8: Vergleich der ACTH-Dreißigminutenwerte (pg/ml) mit und ohne Proband 2

TRH-Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	n	Median	1./3. Quartil	Minimum – Maximum	p-Wert
0,5	18	42	34/79	21 – 194	0,0005
2,0	18	57	39/101	23 – 263	
0,5	17*	40	34/74	21 – 194	0,02
2,0	17*	56	39/81	23 – 229	

*ohne Proband 2

Es wiesen 16 Probanden 30 Minuten nach TRH-Gabe bei der Dosis von 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ einen höheren ACTH-Wert als nach 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TRH auf. Bei Proband 1 und 14 waren die ACTH-Werte bei beiden Tests gleich hoch (Abb. 6).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

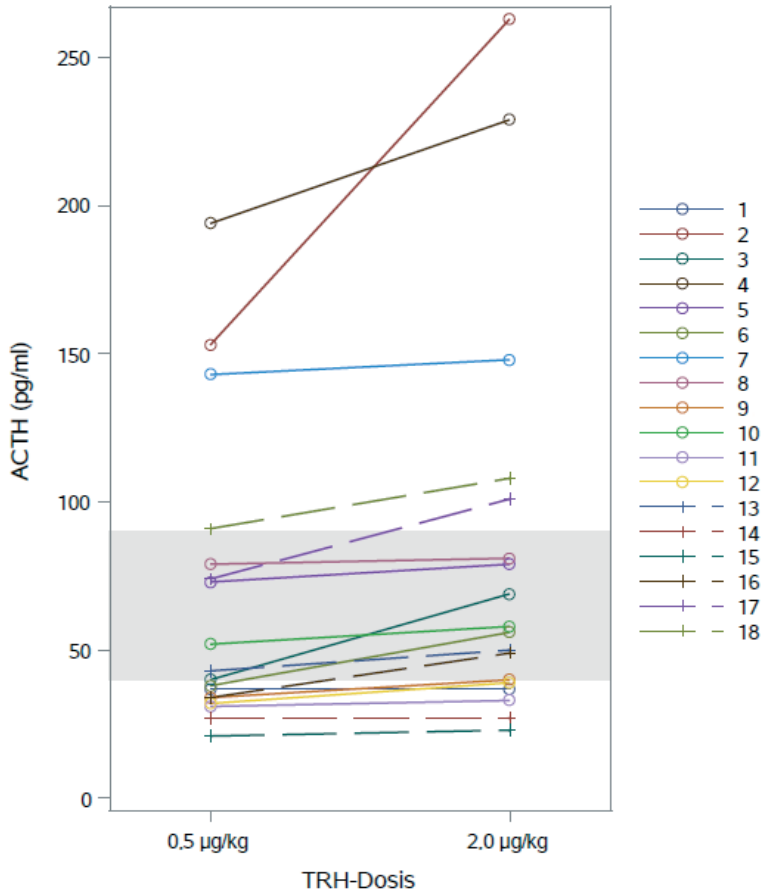


Abb. 6: ACTH-Dreißigminutenwerte der 18 Probanden nach den beiden TRH-Dosierungen 0,5 µg/kg und 2,0 µg/kg; grau hinterlegt ist der laut Hart et al. (2023) als *Interpretive Zone* (Januar bis Juni) im Hinblick auf eine PPID-Diagnose bezeichnete ACTH-Bereich

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.2.2.5 ACTH-Maximalwerte und Zeitpunkt ihres Auftretens

Die individuellen ACTH-Maximalwerte wurden immer zum ersten Messzeitpunkt 5 Minuten nach TRH-Injektion erreicht und wiesen deutliche Unterschiede zwischen den Individuen auf. Die starken Schwankungen spiegeln sich in der recht hohen Standardabweichung vor allem nach 2,0 µg/kg TRH wider (Tab. 9).

Tab. 9: ACTH-Maximalwerte (pg/ml) der 18 Probanden

TRH-Dosis (µg/kg)	n	MW	SD	Median	1./3. Quartil	Minimum – Maximum
0,5	18	442	294	389	182/718	59 – 941
2,0	18	552	469	382	202/741	82 – 1640

Bei einem Drittel der Probanden war der ACTH-Maximalwert nach der geviertelten TRH-Dosierung sogar höher als nach 2 µg/kg TRH. Bei den restlichen zwölf Probanden verhielt es sich umgekehrt. Die Maximalwerte wurden vor der statistischen Auswertung log₁₀ transformiert. Bei der statistischen Prüfung auf Unterschiede wurden für die drei fixen Effekte „Sequenz“, „Reihenfolge“ und „TRH-Dosis“ keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

3.2.2.6 Intraindividuelle ACTH-Verläufe

Auf den folgenden Seiten werden die individuellen Verlaufskurven des ACTHs (pg/ml) über 120 Minuten nach 0,5 und 2,0 µg/kg TRH dargestellt. Die entsprechend der Randomisierungsliste zuerst verabreichte Dosis ist in den Abbildungen durch eine durchgezogene Linie gekennzeichnet. Die Grafiken sind nach aufsteigend skaliertes y-Achse (ACTH-Werte) sortiert. Aufgrund der hohen interindividuellen Variabilität der ACTH-Maximalwerte ergeben sich stark unterschiedlich skalierte y-Achsen.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

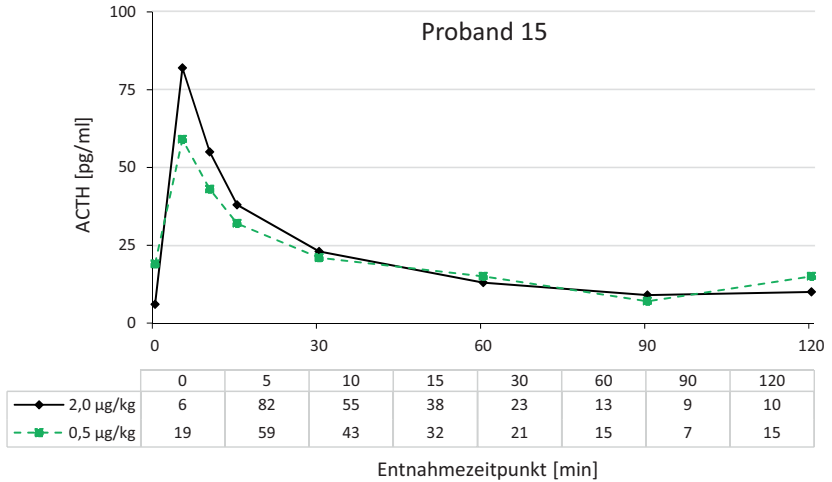


Abb. 7: Proband 15 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar

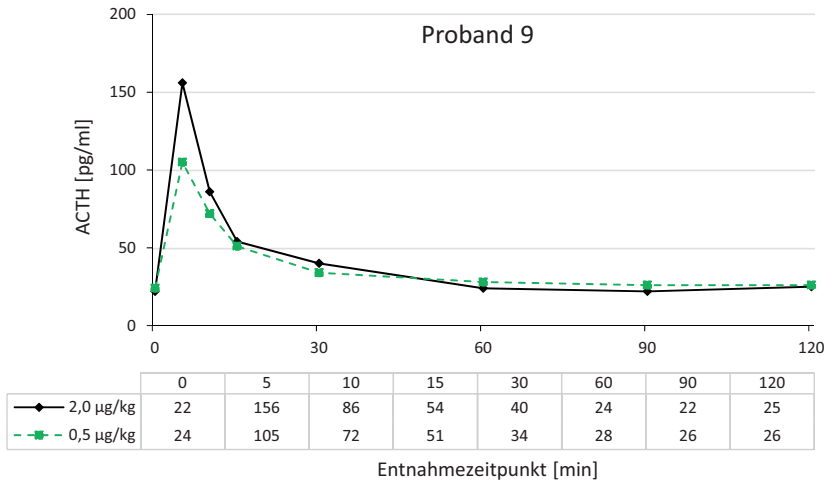


Abb. 8: Proband 9 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

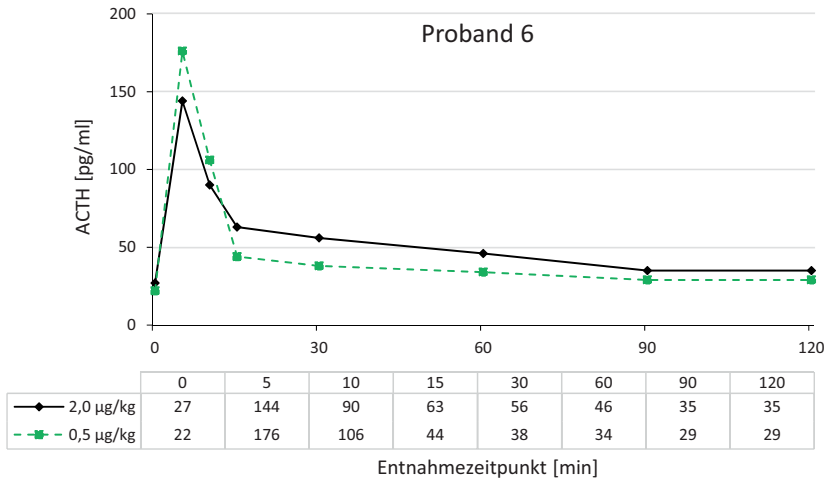


Abb. 9: Proband 6 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar

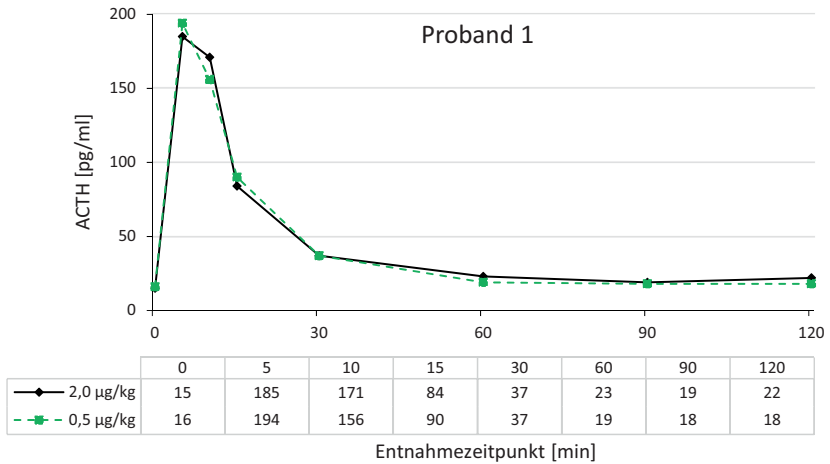


Abb. 10: Proband 1 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe nach 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

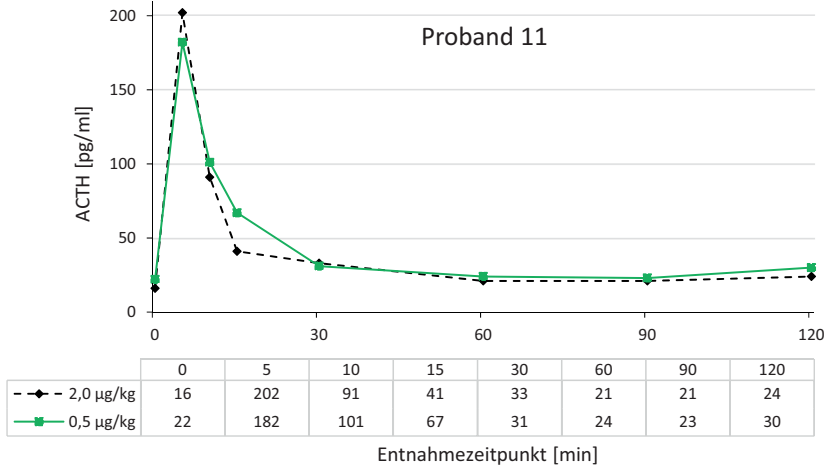


Abb. 11: Proband 11 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten),
zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar

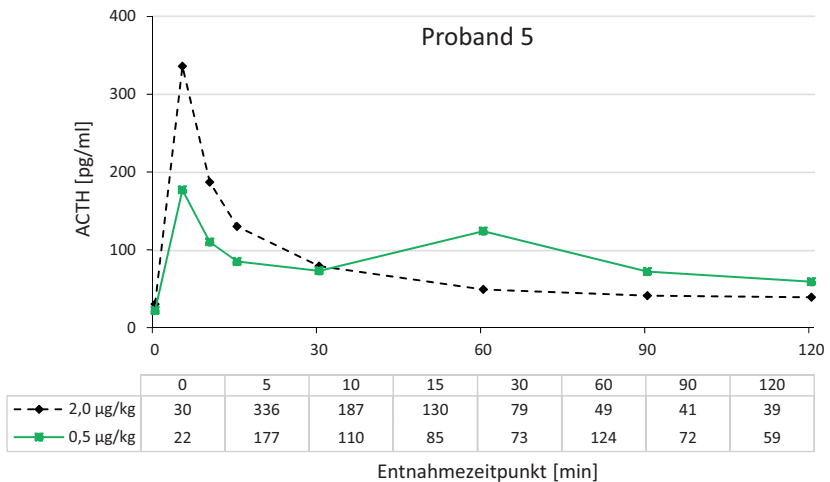


Abb. 12: Proband 5 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten),
zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

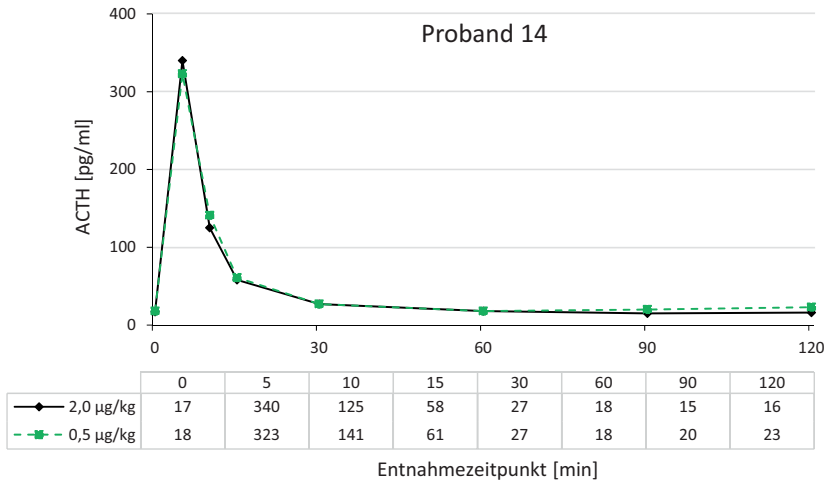


Abb. 13: Proband 14 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten),
zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar

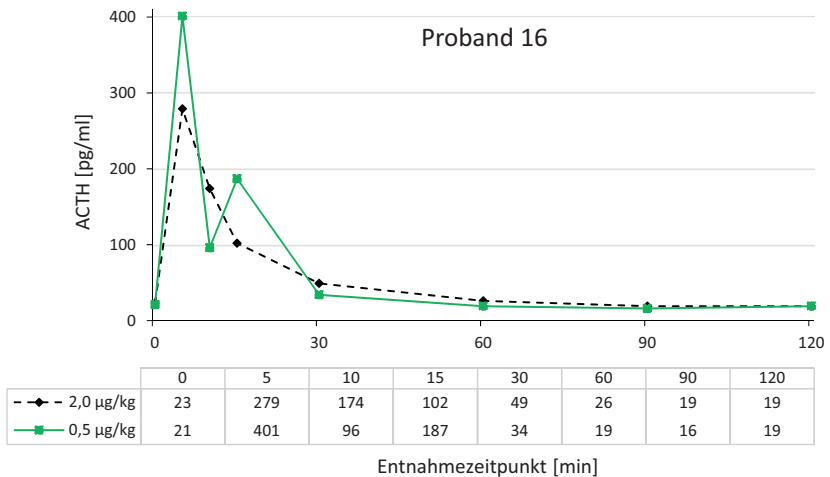


Abb. 14: Proband 16 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten),
zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

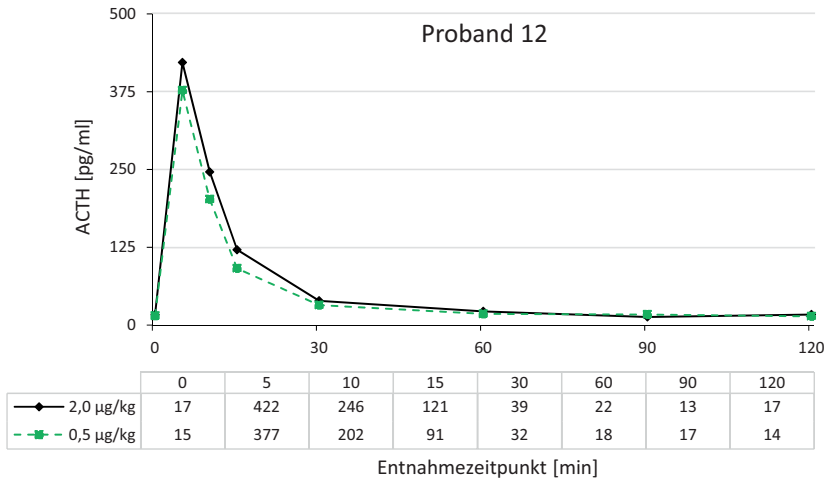


Abb. 15: Proband 12 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar

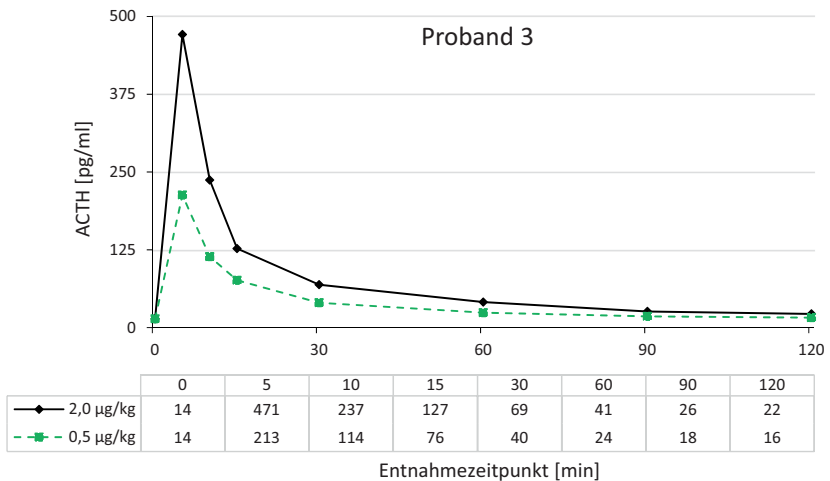


Abb. 16: Proband 3 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

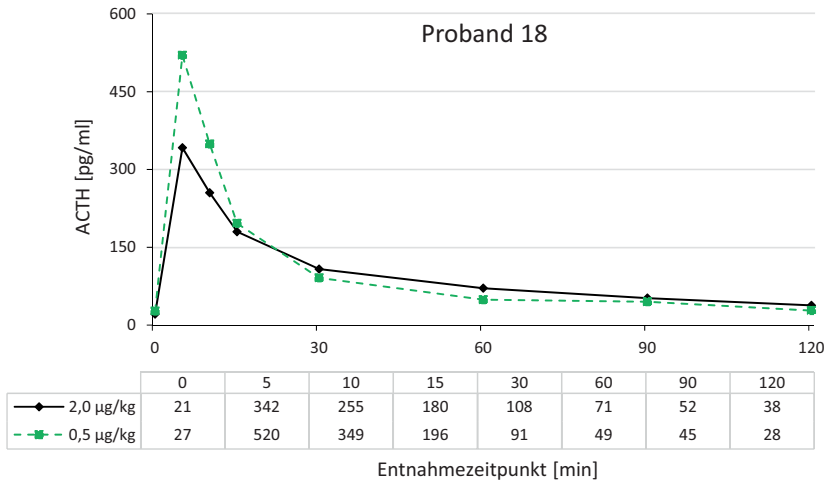


Abb. 17: Proband 18 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten),
zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar

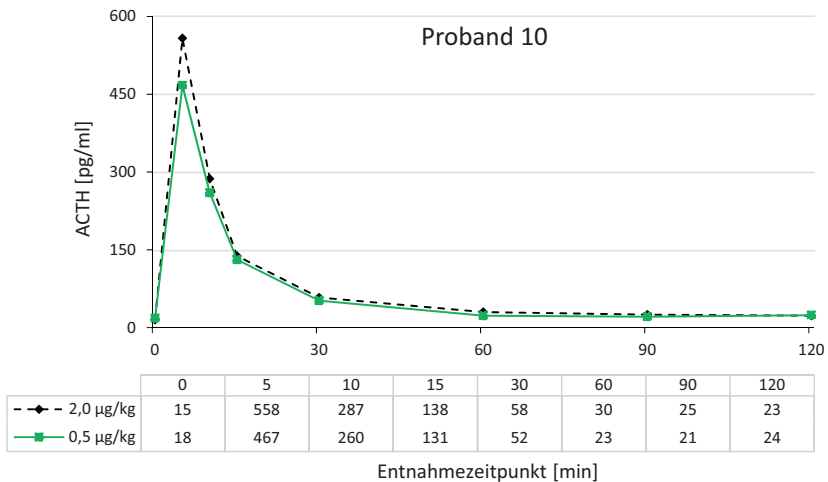


Abb. 18: Proband 10 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten),
zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

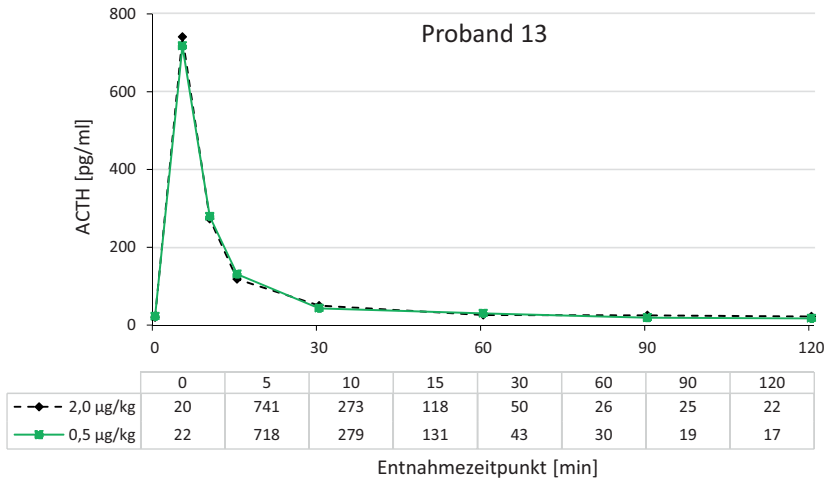


Abb. 19: Proband 13 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten),
zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar

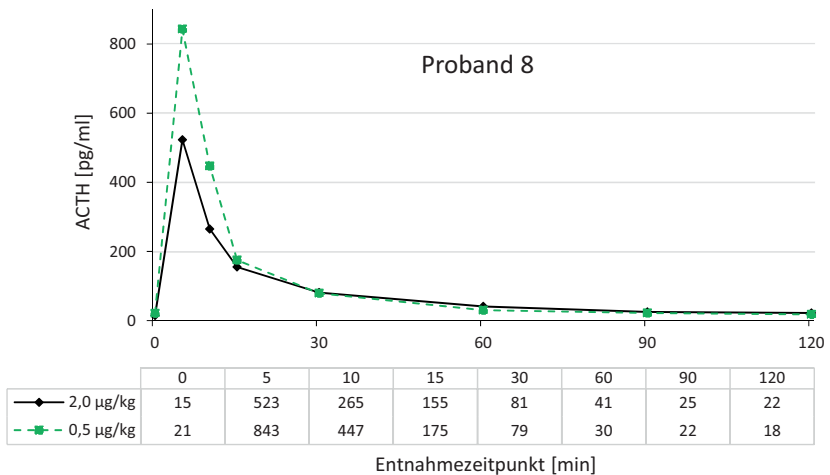


Abb. 20: Proband 8 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten),
zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

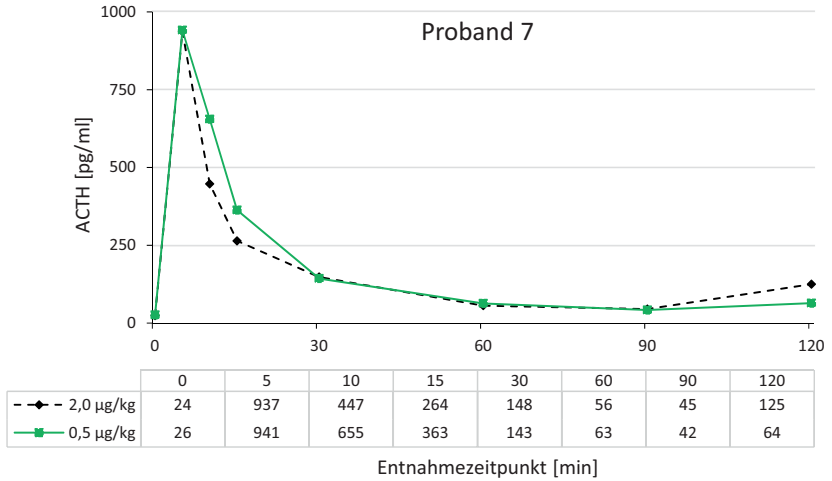


Abb. 21: Proband 7 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar

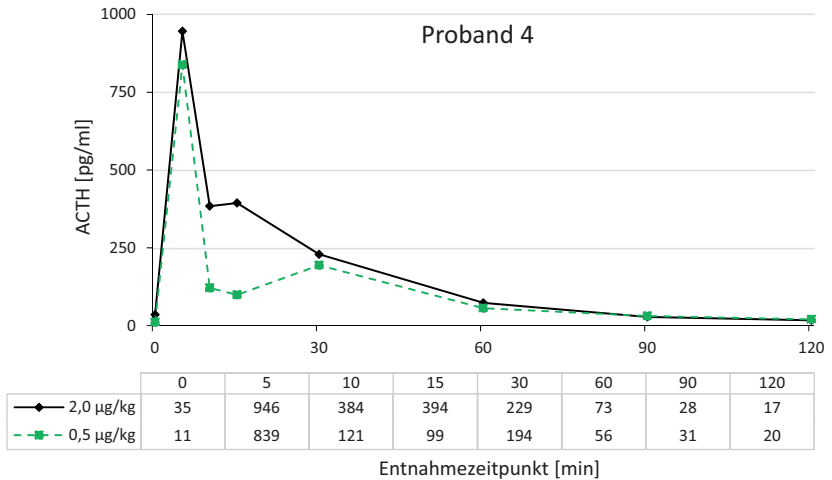


Abb. 22: Proband 4 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

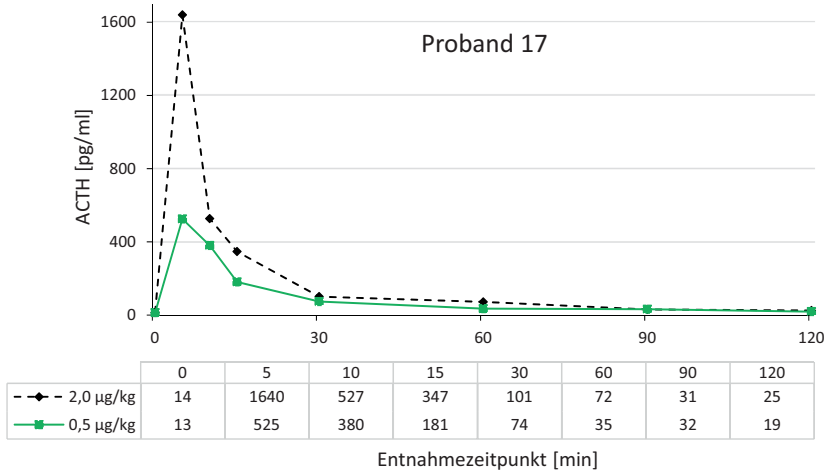


Abb. 23: Proband 17 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar

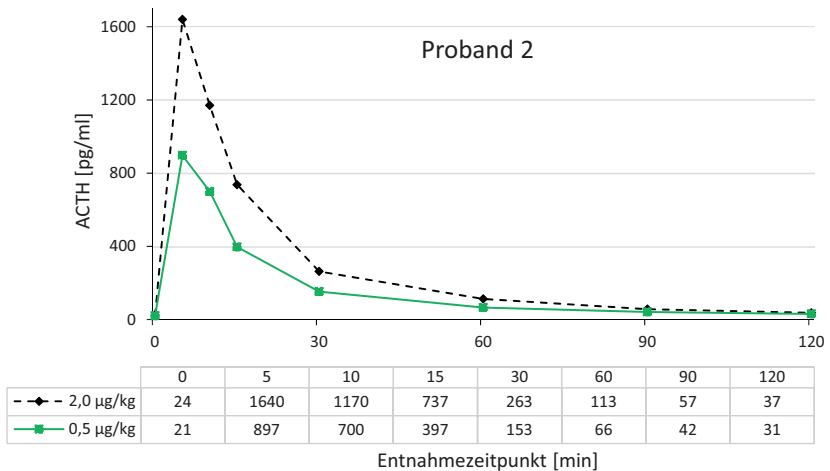


Abb. 24: Proband 2 nach 0,5 bzw. 2,0 µg/kg TRH (ACTH-Verläufe über 120 Minuten), zuerst verabreichte Dosierung durch durchgezogene Linie erkennbar

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Wie aus den vorangestellten Grafiken ersichtlich, gab es sieben Probanden, die bei beiden TRH-Dosierungen einen auffallend ähnlichen ACTH-Kurvenverlauf aufwiesen (Proband 1, 7, 10, 11, 12, 13 und 14). Es gab aber auch acht Individuen, bei denen eine der beiden Dosierungen einen deutlich höheren Peak auslöste. Einerseits erzeugte die TRH-Dosis von 2 µg/kg bei Proband 2, 3, 9, 15 und 17 einen höheren ACTH-Maximalwert. Andererseits wurden bei Proband 6, 8 und 18 mit der niedrigeren TRH-Dosis von 0,5 µg/kg deutlich höhere ACTH-Peaks bewirkt.

Vier Individuen (Proband 4, 5, 7 und 16) zeigten bei mindestens einer Dosierung einen auffälligen Kurvenverlauf. Ihre ACTH-Kurven fielen nicht wie üblich nach dem Maximum 5 Minuten nach TRH kontinuierlich ab. Proband 4 (Abb. 22) zeigte bei beiden Dosierungen nach dem initialen Peak einen erneuten kleineren Anstieg 15 und 30 Minuten nach TRH. Zwei weitere Probanden wiesen einen zweiten ACTH-Peak nach 0,5 µg/kg TRH auf: Proband 16 (Abb. 14) nach 15 Minuten und Proband 5 (Abb. 12) erst nach 60 Minuten. Bei Proband 5 fiel außerdem die relativ niedrige maximale ACTH-Konzentration 5 Minuten nach TRH-Applikation auf. Es wurde im Nachhinein geprüft, ob dies möglicherweise durch eine verzögerte Blutentnahme verursacht gewesen sein könnte. Für das Timing der Blutentnahmen wurde eine digitale Uhr mit Sekundenzähler verwendet, die einwandfrei funktionierte. Auch die Benutzung des Venenkatheters, die Injektionen der Spüllösung sowie Blutaspirationen verliefen problemlos. Der zweite, relativ späte ACTH-Peak nach 60 Minuten, und dass der ACTH-Wert 120 Minuten nach TRH-Injektion mit 59 pg/ml noch deutlich über dem Ausgangswert von 22 pg/ml lag, stellten eine weitere Auffälligkeit des Kurvenverlaufs bei Proband 5 dar. Aus den Aufzeichnungen gingen keine Besonderheiten, wie z.B. Aufregung hervor, sodass keine Erklärung dafür gefunden werden konnte.

Auch bei Proband 7 (Abb. 21) lagen die ACTH-Werte 120 Minuten nach beiden TRH-Injektionen über dem basalen Niveau. Dieses Pferd zeigte zudem in beiden Tests niedrigere ACTH-Werte nach 90 als nach 120 Minuten. Die Ponystute erschien der Autorin zum Zeitpunkt der jeweils letzten Blutentnahme an beiden Tagen innerlich leicht angespannt und scheu beim Handling am Venenkatheter. Auch hierfür ließ sich keine Erklärung finden.

3.2.3 Therapiestudie

Aufgrund der ACTH-Zehnminutenwerte im TRH-Stimulationstest mit 2 µg/kg wurden zehn Pferde hinsichtlich einer PPID labordiagnostisch als *PPID likely* und vier Pferde als *equivocal* eingestuft. Dreizehn dieser Pferde konnten in die Therapiestudie aufgenommen werden (Tab. 3). Proband 5 wurde nicht eingeschlossen, da sein ACTH 10 Minuten nach 2 µg/kg TRH zunächst mit 18 pg/ml bestimmt wurde. Somit hätte ein extrem niedriger Wert vorgelegen, der zudem zu einem untypischen ACTH-Kurvenverlauf führte. Im Nachhinein wurden die Rückstellproben dieses Tests erneut analysiert. Die Werte zeigten dann einen normalen Kurvenverlauf und eine Einstufung des Probanden in die *Interpretive Zone*, da der ACTH-Zehnminutenwert 187 pg/ml betrug. Bis diese plausiblen Ergebnisse vorlagen war es allerdings zu spät, um den Probanden in die Therapiestudie aufzunehmen.

Im Rahmen dieses Studienabschnitts wurde zuerst eine vier- bis sechswöchige Placebogabe und im Anschluss eine vier- bis sechswöchige Pergolidgabe durchgeführt, ohne dass den Besitzern bekannt war, welche Substanz sie verabreichten. Die Probanden erhielten im Mittel 35 ± 4 Tage (28-41 Tage) das Placebo und 39 ± 3 Tage (34-42 Tage) das Verum. Sowohl nach der Placebo- als auch der Pergolidgabe wurde neben klinischen Kontrollen ein TRH-Stimulationstest durchgeführt. Für diese Tests wurde immer die empfohlene TRH-Dosis von 2 µg/kg verwendet (Hart et al. 2023). Somit erfolgten bei allen 13 Probanden der Therapiestudie drei TRH-Tests mit 2 µg/kg TRH. Der erste Test wird im Folgenden als „initial“ bezeichnet, gefolgt vom TRH-Test „post Placebo“ und „post Therapie/Pergolid“.

3.2.3.1 ACTH-AUCs

Für die statistische Auswertung wurden die AUCs für den Parameter ACTH im Zeitraum von 0 bis 120 Minuten nach TRH-Injektion errechnet. Um eine annähernde Normalverteilung der Daten zu erreichen, mussten diese logarithmiert werden. Anschließend wurden t-Tests für gepaarte Stichproben angewandt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den AUCs, weder beim Vergleich der Werte post Placebo und post Therapie ($p = 0,17$), initial und post Therapie ($p = 0,10$) noch initial und post Placebo ($p = 0,33$).

Trotz fehlender Signifikanz gab es optisch einen Trend zu geringfügig niedrigeren ACTH-AUCs nach Therapie (Abb. 25).

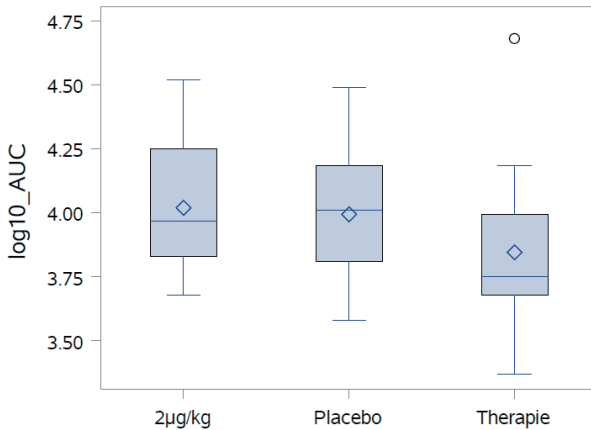


Abb. 25: ACTH-AUCs initial, nach Placebo und nach Therapie ($n = 13$); Boxplots mit Median, Quartilen sowie als Antennenenden Minimum und Maximum; als Ausreißer (Kreis) werden Werte über dem 1,5-fachen Interquartilsabstand angegeben

3.2.3.2 Übersicht ACTH-Werte

Die individuellen ACTH-Basal-, Zehnminuten- und Dreißigminutenwerte aller 13 Probanden, die an der Therapiestudie teilgenommen haben, sind in Tab. 10 gegenübergestellt. Es ist zu erkennen, dass die Medianwerte 10 und 30 Minuten nach TRH post Pergolid niedriger sind als post Placebo – allerdings werden die Spannweiten auch größer. Dies mag erklären, warum es statistisch keine signifikanten Unterschiede in den ACTH-Werten gab. Die Ergebnisse werden in den Folgekapiteln detailliert dargestellt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tab. 10: ACTH-Werte (pg/ml) nach TRH-Tests der 13 Probanden der Therapiestudie

Proband Nr.	0 min			10 min			30 min		
	Initial	Post Placebo	Post Pergolid	Initial	Post Placebo	Post Pergolid	Initial	Post Placebo	Post Pergolid
1	15	21	21	171	110	154	37	38	51
2	24	24	18	1170	1120	505	263	232	108
3	14	18	14	237	143	114	69	61	45
4	35	20	19	384	446	142	229	178	45
7	24	17	25	447	436	117	148	135	38
8	15	10	28	265	153	85	81	58	32
10	15	19	14	287	357	389	58	58	46
12	17	22	20	246	178	501	39	27	89
13	20	18	15	273	148	53	50	48	23
14	17	12	15	125	86	37	27	30	20
16	23	25	19	174	215	142	49	60	36
17	14	53	37	527	495	355	101	185	62
18	21	21	64	255	242	1590	108	131	299
MW	19,5	21,5	23,8	351	318	322	97	96	69
SD	5,8	10,0	13,2	259,8	266,9	398,8	71,6	65,7	70,6
Median	17	20	19	265	215	142	69	60	45
Min	14	10	14	125	86	37	27	27	20
Max	35	53	64	1170	1120	1590	263	232	299

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, Min: Minimum, Max: Maximum

3.2.3.2.1 ACTH-Basalwerte

Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den basalen ACTH-Werten der initialen, post Placebo- und post Therapie-Messungen (Abb. 26).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

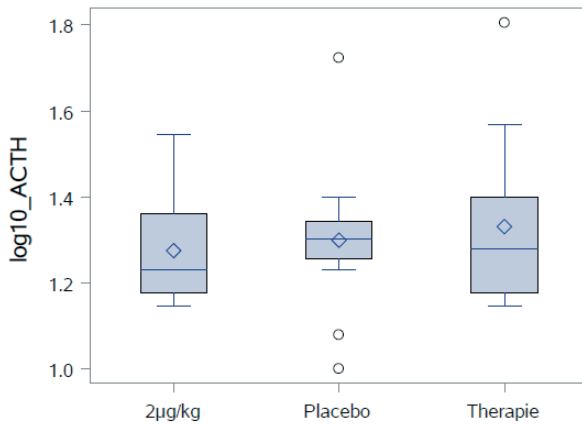


Abb. 26: ACTH-Basalwerte initial, nach Placebo und nach Therapie (n = 13); Boxplots mit Median, Quartilen sowie als Antennenenden Minimum und Maximum; als Ausreißer (Kreis) werden Werte über dem 1,5-fachen Interquartilsabstand angegeben

Die basalen ACTH-Konzentrationen blieben bei den meisten Probanden in einem sehr ähnlichen Bereich (Abb. 27). Bei 7 der 13 Probanden lagen sie zu allen drei Zeitpunkten in der *Interpretive Zone* von 15 bis 40 pg/ml. Bei vier Probanden variierte der Basalwert je nach Testtag zwischen dem negativen und *equivocal* Bereich. Bei Proband 17 fiel auf, dass der basale ACTH-Wert jedes Mal in einer anderen Kategorie lag. So wurde der initiale Wert von 14 pg/ml im Februar als *PPID unlikely* eingestuft, der ACTH-Wert nach Placebo mit 53 pg/ml war *PPID likely* und der Wert nach Pergolid befand sich mit 37 pg/ml in der oberen *Interpretive Zone*. Zudem fiel auf, dass Proband 18 ausgerechnet post Therapie einen ca. 3-fach höheren basalen ACTH-Wert (64 pg/ml) aufwies als initial und post Placebo (beide 21 pg/ml).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

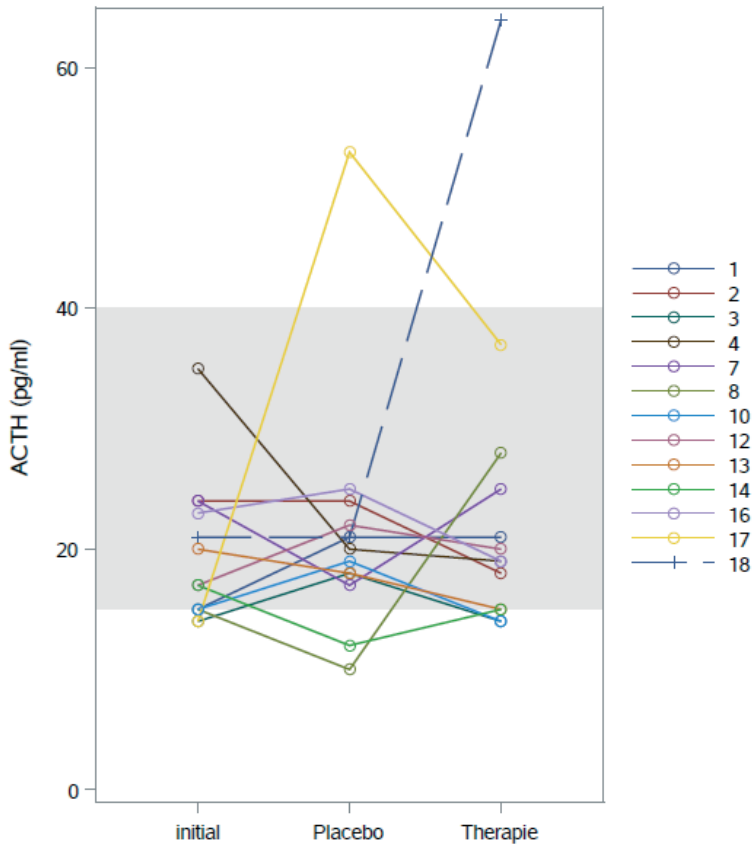


Abb. 27: ACTH-Basalwerte der 13 Probanden initial, nach Placebo und nach Therapie; grau hinterlegt ist der laut Hart et al. (2023) als *Interpretive Zone* (Dezember bis Juni) im Hinblick auf eine PPID-Diagnose bezeichnete ACTH-Bereich

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.2.3.2.2 ACTH-Zehnminutenwerte

Zwischen den post Placebo- und post Therapie-Werten des ACTHs 10 Minuten nach TRH-Injektion ergaben sich ebenso wenig statistisch signifikante Unterschiede wie beim Vergleich der initialen Werte mit jenen post Therapie. Allerdings zeigten sich schwach signifikant ($p = 0,04$) niedrigere Werte nach Placebo ($\log_{10_ACTH_{10 \text{ min}}}$: $2,39 \pm 0,31$ pg/ml) als initial ($\log_{10_ACTH_{10 \text{ min}}}$: $2,47 \pm 0,25$ pg/ml).

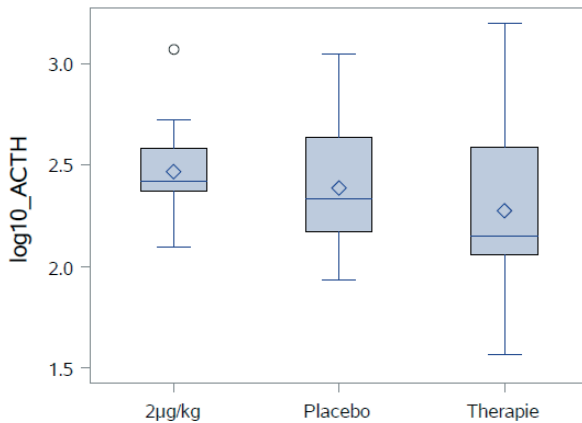


Abb. 28: ACTH-Zehnminutenwerte initial, nach Placebo und nach Therapie ($n = 13$); Boxplots mit Median, Quartilen sowie als Antennenenden Minimum und Maximum; als Ausreißer (Kreis) werden Werte über dem 1,5-fachen Interquartilsabstand angegeben

Immerhin ließ sich nach Therapie optisch eine weitere Tendenz zu einem niedrigeren Median (142; 114/389 pg/ml) erkennen, allerdings streuten die Daten nach Therapie auch am meisten (Abb. 29).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

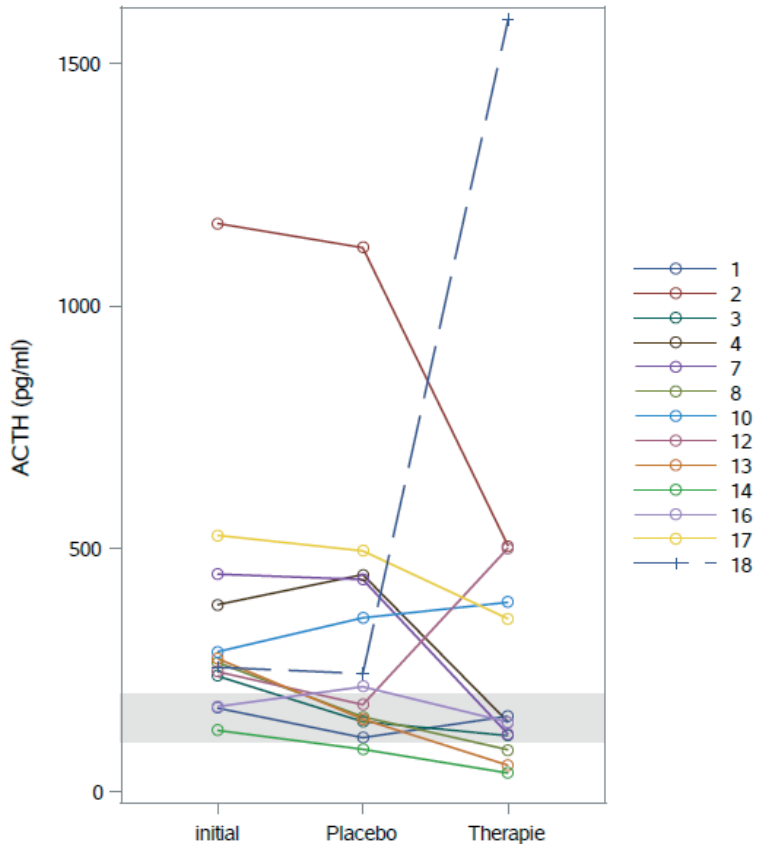


Abb. 29: ACTH-Zehnminutenwerte der 13 Probanden initial, nach Placebo und nach Therapie; grau schraffiert ist der laut Hart et al. (2023) als *Interpretive Zone* (Januar bis Juni) im Hinblick auf eine PPID-Diagnose bezeichnete ACTH-Bereich

Die ACTH-Werte 10 Minuten nach TRH-Injektion wurden auch genutzt, um zu überprüfen, ob sich die individuelle Einordnung in eine der von der EEG definierten Kategorien (*PPID unlikely / Interpretive Zone / PPID likely*) nach Therapie ändert.

Post Pergolid war im Vergleich zu post Placebo bei fünf Probanden (Proband 4, 7, 8, 13, 16) eine Besserung der EEG Kategorie festzustellen. Sieben Probanden blieben gleich

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

kategorisiert, wobei einer davon (Proband 14) bereits nach Placebo als *PPID unlikely* eingestuft wurde. Proband 12 verschlechterte sich von *equivocal* zu *PPID likely*. Wenn man die initialen ACTH-Zehnminutenwerte mit jenen nach Pergolid vergleicht, war bei sechs Probanden eine Besserung der EEG Kategorie festzustellen. Allerdings verbesserten sich fünf Probanden ebenfalls um eine Stufe, wenn man ihre initialen ACTH-Zehnminutenwerte mit jenen nach der vier- bis sechswöchigen Placebogabe verglich.

Proband 2, eine 21 Jahre alte Ponystute, zeigte initial mit 1170 pg/ml den mit Abstand höchsten ACTH-Wert 10 Minuten nach TRH-Gabe. Während sich dieser Wert und der generelle Kurvenverlauf nach Placebo (1120 pg/ml) kaum veränderte, fiel post Therapie eine deutlich flachere Kurve und ein ACTH-Zehnminutenwert von nur noch 505 pg/ml auf (Abb. 43). Dieses Beispiel zeigt eine Verringerung des ACTHs nach Pergolidtherapie, die zwar im Kurvenverlauf, aber nicht in der EEG Kategorie sichtbar war.

Proband 18, ein 28-jähriger arabischer Vollblutwallach, zeigte initial und nach Placebogabe ähnliche ACTH-Zehnminutenwerte sowie nahezu identische Kurvenverläufe. Auffallend war allerdings das Ergebnis des Tests nach Therapie mit Pergolid, bei dem sich der Zehnminutenwert von initial 255 auf 1590 pg/ml ungefähr versechsfachte (Abb. 45).

3.2.3.2.3 ACTH-Dreißigminutenwerte

Es ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Testzeitpunkten in den ACTH-Werten 30 Minuten nach TRH-Verabreichung feststellen. Optisch schien allerdings eine Tendenz zu niedrigeren Werten nach Therapie zu bestehen (Abb. 30). Den Ausreißer beim letzten TRH-Test stellte wieder Proband 18 dar, dessen ACTH-Dreißigminutenwert sich von initial 108 über 131 nach Placebo auf 299 pg/ml nach Therapie steigerte.

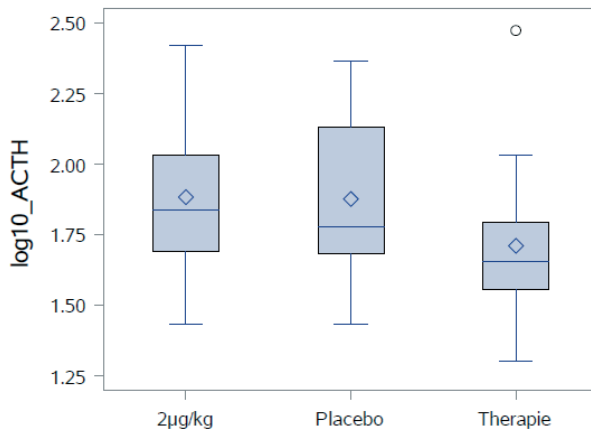


Abb. 30: ACTH-Dreißigminutenwerte initial, nach Placebo und nach Therapie (n = 13); Boxplots mit Median, Quartilen sowie als Antennenenden Minimum und Maximum; als Ausreißer (Kreis) werden Werte über dem 1,5-fachen Interquartilsabstand angegeben

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

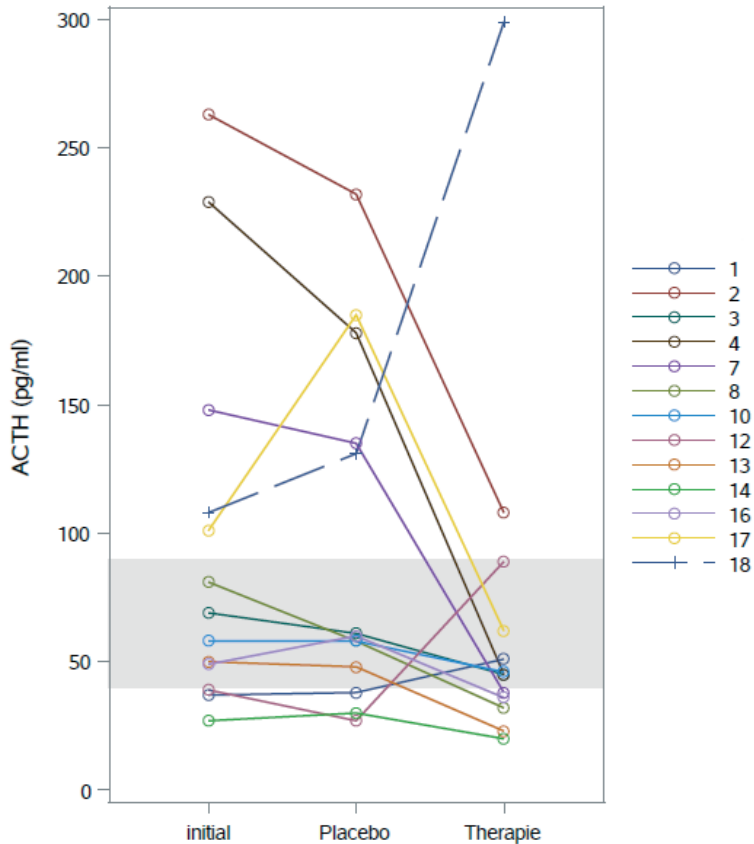


Abb. 31: ACTH-Dreißigminutenwerte der 13 Probanden initial, nach Placebo und nach Therapie; grau hinterlegt ist der laut Hart et al. (2023) als *Interpretive Zone* (Januar bis Juni) im Hinblick auf eine PPID-Diagnose bezeichnete ACTH-Bereich

3.2.3.2.4 ACTH-Maximalwerte und Zeitpunkt ihres Auftretens

Hinsichtlich der ACTH-Maximalwerte und des Zeitpunktes ihres Auftretens wurden keine signifikanten Unterschiede bei den Vergleichen von jeweils zwei Gruppen (post Placebo und post Therapie, initial und post Therapie sowie initial und post Placebo) festgestellt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Beim Vergleich der medianen ACTH-Maximalwerte zu den drei Testzeitpunkten fiel auf, dass der Median post Therapie mit 235 (154/665) pg/ml zwar am niedrigsten lag, die Daten aber zu diesem Zeitpunkt auch die weiteste Streuung aufwiesen.

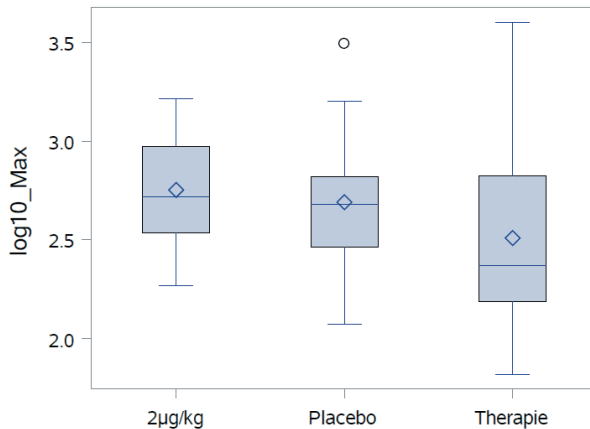


Abb. 32: ACTH-Maximalwerte initial, nach Placebo und nach Therapie (n = 13); Boxplots mit Median, Quartilen sowie als Antennenenden Minimum und Maximum; als Ausreißer (Kreis) werden Werte über dem 1,5-fachen Interquartilsabstand angegeben

Die maximalen ACTH-Werte wurden mit zwei Ausnahmen bei allen TRH-Stimulationstests 5 Minuten nach der TRH-Injektion gemessen. Post Placebo erreichte Proband 8 erst nach 15 Minuten und post Therapie zeigte Proband 1 erst nach 10 Minuten sein jeweiliges ACTH-Maximum.

3.2.3.2.5 Intraindividuelle ACTH-Verläufe

Im Folgenden werden die intraindividuellen Kurvenverläufe vor Therapie (initial), nach Placebo- und nach Pergolidgabe dargestellt. Aufgrund der hohen interindividuellen Variabilität sind die stark unterschiedlich skalierten y-Achsen zu beachten. Die Grafiken sind nach aufsteigend skaliertem y-Achse (ACTH-Werte) sortiert.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

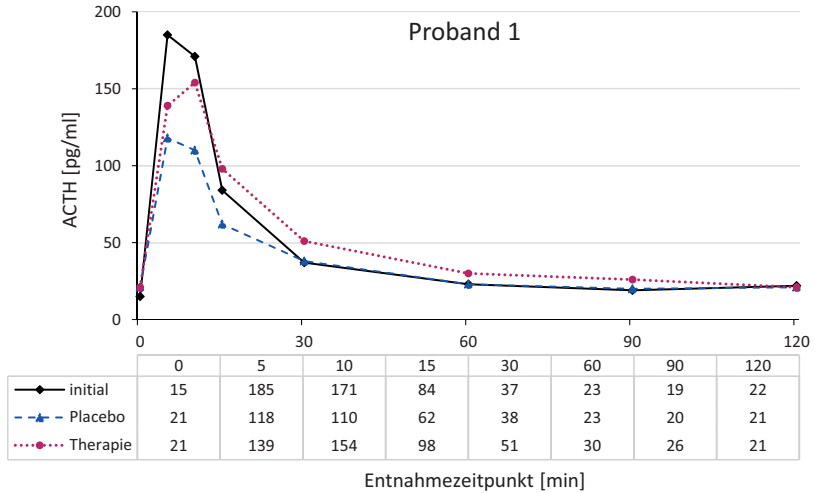


Abb. 33: Proband 1 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten)

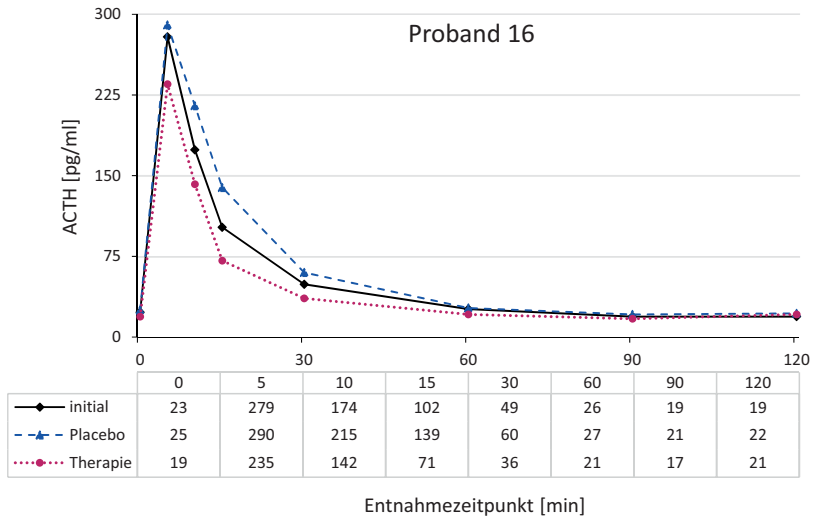


Abb. 34: Proband 16 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

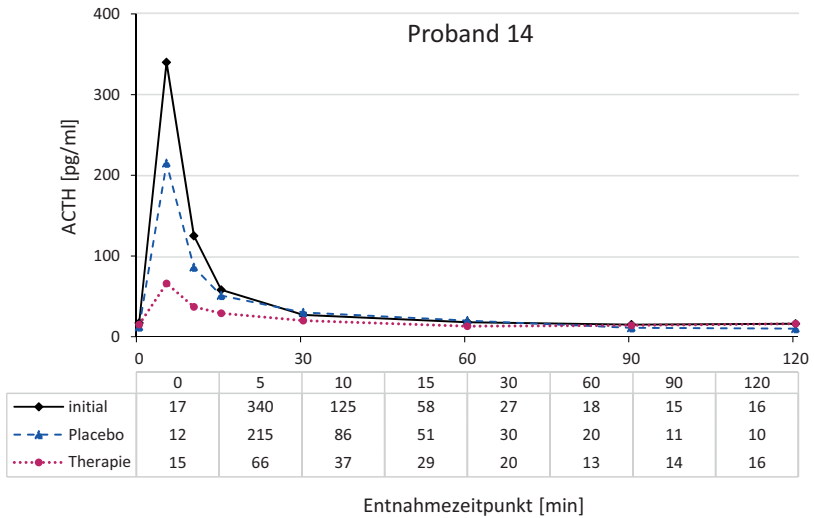


Abb. 35: Proband 14 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten)

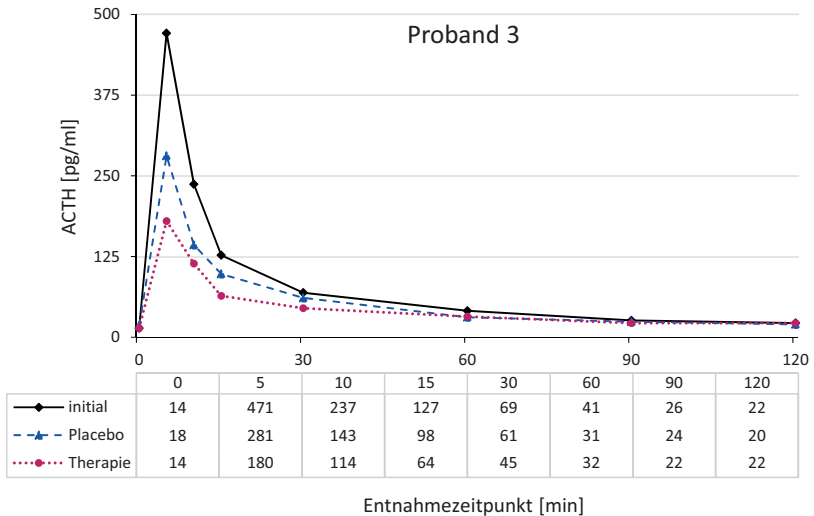


Abb. 36: Proband 3 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

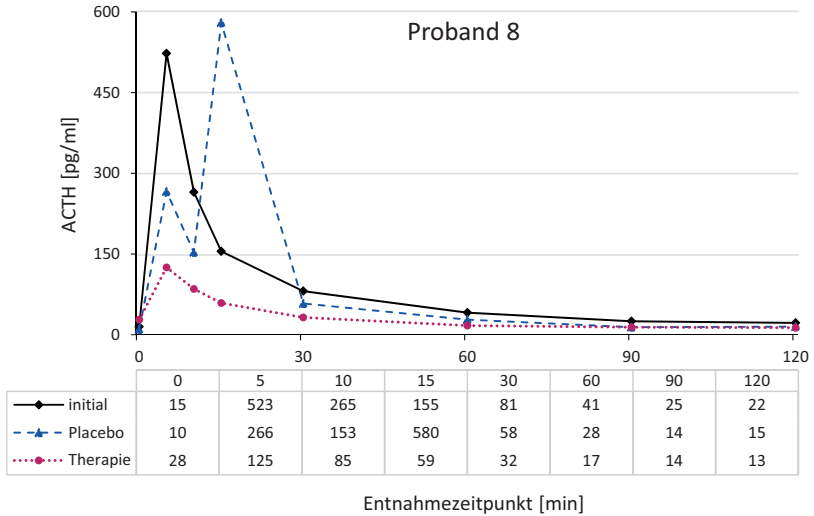


Abb. 37: Proband 8 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten)

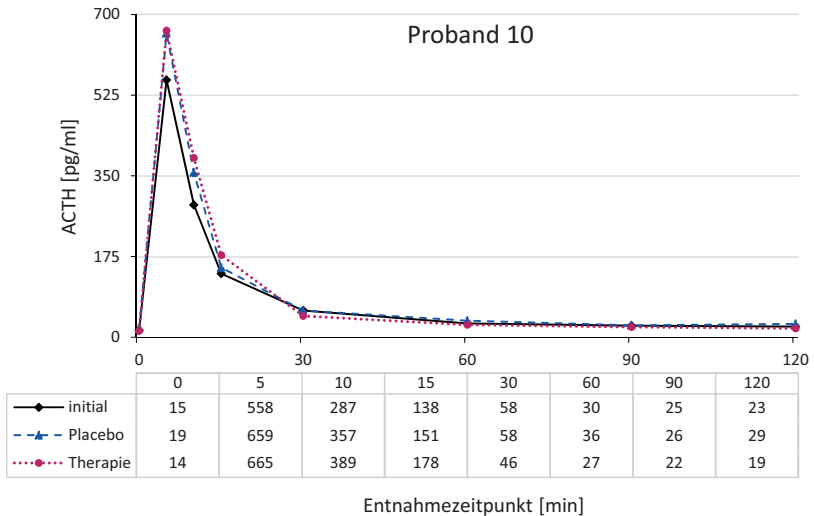


Abb. 38: Proband 10 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

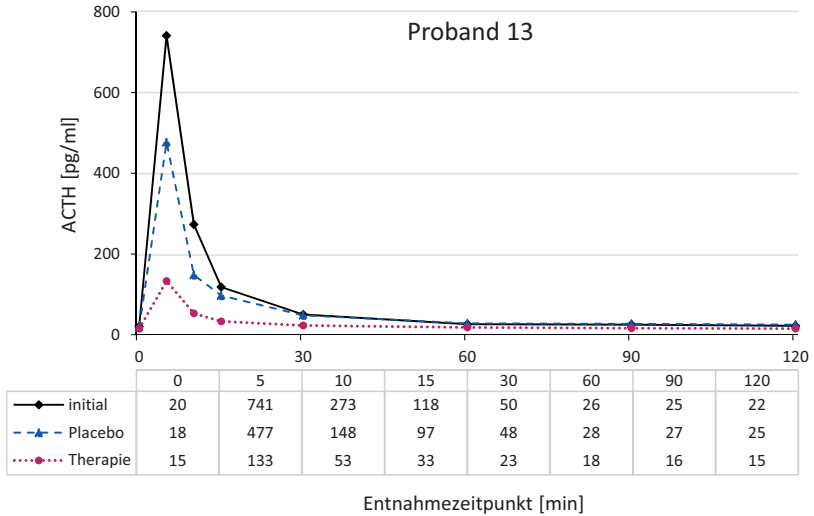


Abb. 39: Proband 13 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten)

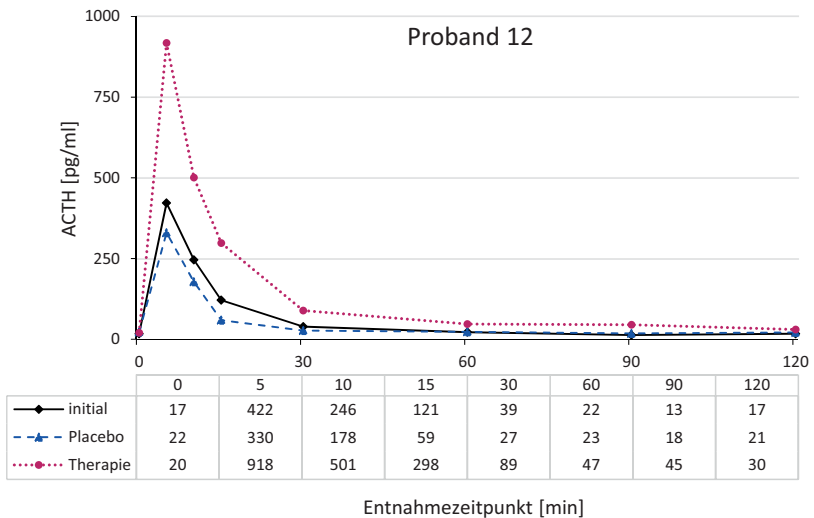


Abb. 40: Proband 12 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

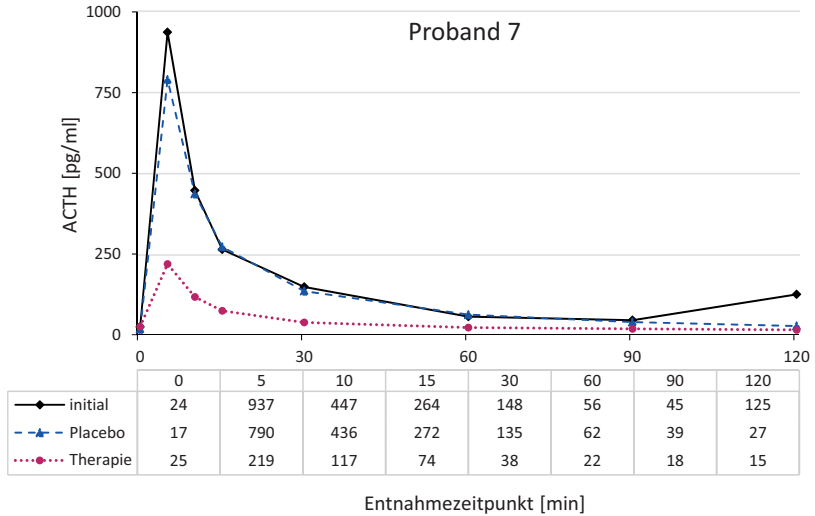


Abb. 41: Proband 7 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten)

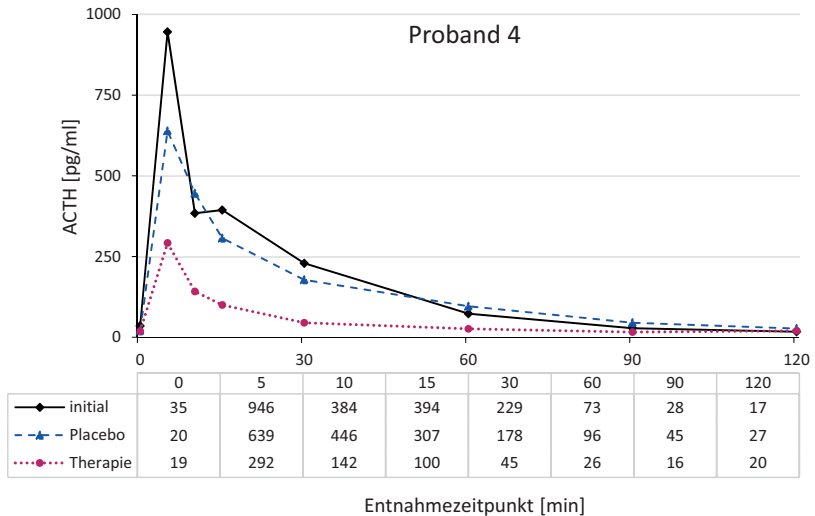


Abb. 42: Proband 4 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

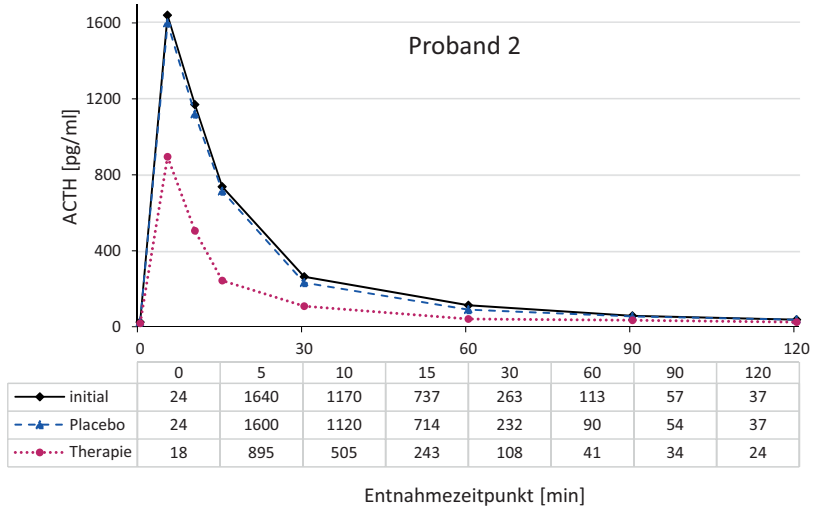


Abb. 43: Proband 2 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten)

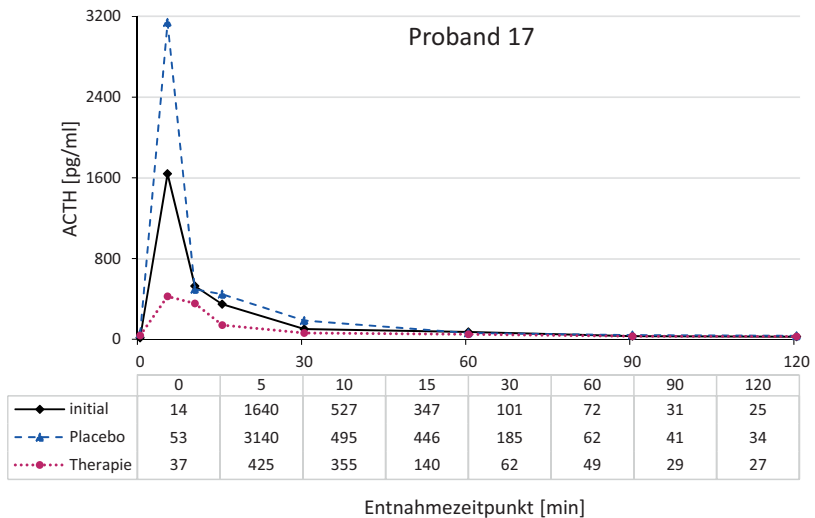


Abb. 44: Proband 17 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

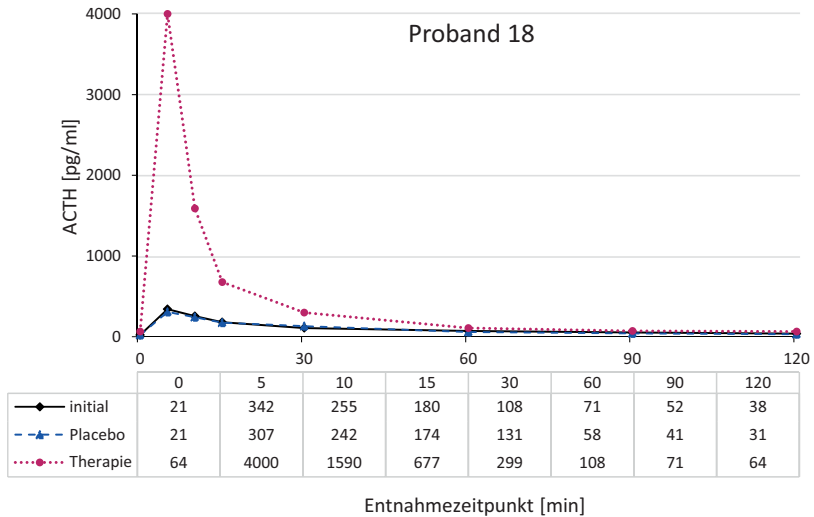


Abb. 45: Proband 18 initial, nach Placebo und nach Therapie (ACTH-Verläufe über 120 Minuten)

Vergleicht man rein optisch die Kurven nach Therapie mit jenen der vorangegangenen TRH-Tests, so schienen insgesamt acht (61,5 %) Probanden (Proband 2, 3, 4, 7, 8, 13, 14 und 17) auf das Pergolid angesprochen zu haben. Bei drei Probanden (Proband 1, 10 und 16) war zumindest kein deutlicher Effekt zu verzeichnen und bei den Probanden 12 und 18 kam es sogar zu sehr deutlich erhöhten ACTH-Ausschüttungen post Pergolid.

3.2.4 Basales Insulin

Die basalen Insulinkonzentrationen wurden bei jedem Probanden nach mindestens 12-stündigem Kraftfutterentzug und mindestens 2-stündigem Heuentzug unmittelbar vor der TRH-Injektion gemessen (Tab. 11). Alle Werte fielen in den laboreigenen Referenzbereich von 1,0 - 13,1 $\mu\text{U/ml}$ (Biocontrol, Bioscientia Healthcare GmbH, Ingelheim).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tab. 11: Insulinkonzentrationen der 18 Probanden

Proband Nr.	Insulin basal ($\mu\text{U/ml}$)			
	0,5 $\mu\text{g/kg}$ TRH	2,0 $\mu\text{g/kg}$ TRH	Post Placebo	Post Pergolid
1	1,5	1,4	1,9	1,3
2*	2,2	2,9	3,1	3,7
3	2,6	2,4	3,4	3,4
4	3,1	3,4	3,1	3,8
5	1,4	1,1	-	-
6*	4,3	6,2	-	-
7	2,0	1,5	1,4	2,0
8	1,9	2,2	2,1	2,0
9	10,2	10,8	-	-
10	2,5	4,2	4,5	4,1
11*	2,3	1,8	-	-
12	2,7	2,8	2,3	1,9
13	3,6	2,9	3,2	2,4
14	2,8	3,7	2,5	1,6
15	4,0	3,4	-	-
16	1,2	1,4	1,2	1,8
17	2,4	1,8	1,1	1,3
18	0,9	1,1	1,4	1,7
Mittelwert	2,9	3,1	2,4	2,4
SD	2,0	2,3	1,0	1,0
Median	2,5	2,6	2,3	2,0
Minimum	0,9	1,1	1,1	1,3
Maximum	10,2	10,8	4,5	4,1

*vorberichtlich Hufrehe

Fett: Body Condition Score zum Testzeitpunkt ≥ 7 von 9 Punkten

Kursiv: Wert vom Labor mit $< 1,0$ angegeben, für Statistik 0,9 angenommen

SD: Standardabweichung

Proband 9, eine 22-jährige Haflingerstute, stach mit ihren Insulinwerten (10,2 und 10,8 $\mu\text{U/ml}$) heraus, da ihre Konzentrationen als einzige im oberen laboreigenem Referenzbereich lagen. Die Stute fiel klinisch mit einem Body Condition Score (BCS) von 7/9 und einem Cresty Neck Score (CNS) von 3/5 auf. Sie zeigte zwar eine geringgradige

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Trachtenfußung, allerdings war in der Anamnese kein Hinweis auf eine jemals bestandene Hufrehe bekannt.

In den derzeit aktuellen „Recommendations for the Diagnosis and Management of Equine Metabolic Syndrome“ der Equine Endocrinology Group (Frank et al. 2022) wurden drei Kategorien für die Interpretation basaler Insulinkonzentrationen erstellt. In der eigenen Studie wurden die Insulinkonzentrationen mit dem ADVIA Centaur® XP gemessen. Um die Probandenwerte auf Grundlage der EEG-Empfehlungen kategorisieren zu können, wurden die Cut-offs bzw. Referenzbereiche mittels Equine Insulin Converter (<https://www.equine-insulin-converter.org/>, letzter Zugriff September 2024) umgerechnet und in Tab. 12 dargestellt (Delarocque et al. 2023). Sämtliche Insulindaten lagen dann im Bereich ohne diagnostischen Wert hinsichtlich eines EMS.

Tab. 12: Interpretation von Insulinkonzentrationen ($\mu\text{U}/\text{ml}$) verschiedener Laborgeräte entsprechend der Empfehlungen der EEG

Interpretation	RIA und Immulite® 1000*	Immulite® 2000 XPi*	ADVIA Centaur® XP#
Kein diagnostischer Wert	< 20 $\mu\text{U}/\text{ml}$	< 31 $\mu\text{U}/\text{ml}$	< 13 $\mu\text{U}/\text{ml}$
Insulindysregulation verdächtig bei bestehenden klinischen Anzeichen	20-50 $\mu\text{U}/\text{ml}$	30-75 $\mu\text{U}/\text{ml}$	13-23 $\mu\text{U}/\text{ml}$
Insulindysregulation	> 50 $\mu\text{U}/\text{ml}$	> 75 $\mu\text{U}/\text{ml}$	> 23 $\mu\text{U}/\text{ml}$

*Werte der EEG-Empfehlung

#umgerechnete Werte mittels Equine Insulin Converter aus Immulite® 1000-Werten

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.2.5 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen

3.2.5.1 TRH

Die unerwünschten Arzneimittelwirkungen des TRHs wurden wie in Kapitel 3.1.6.5 beschrieben über einen Zeitraum von 15 Minuten erfasst und je nach Dauer des Auftretens pro Minute mit Scores bewertet.

Bei allen 62 TRH-Stimulationstests wurden unerwünschte Arzneimittelwirkungen dokumentiert. Die Häufigkeit der Symptome war in den ersten Minuten am höchsten und nahm zum Ende des jeweiligen Beobachtungszeitraums deutlich ab.

Beim statistischen Vergleich der Scores zwischen den beiden Dosierungen (Tab. 13) fiel nur bei dem Symptom „Gähnen“, das 4/18 nach 0,5 und 7/18 Probanden nach 2 µg/kg TRH zeigten, ein schwach signifikanter Unterschied ($p = 0,05$) auf.

Tab. 13: UAW-Scores (Mittelwert \pm Standardabweichung) nach 0,5 und 2,0 µg/kg TRH; exakter Wilcoxon-Rang-Test für gepaarte Beobachtungen ($n = 18$)

Symptom	0,5 µg/kg	2,0 µg/kg	p-Wert
Kauen	6,83 \pm 2,71	7,06 \pm 2,55	0,93
Flehmen	0,28 \pm 0,75	0,17 \pm 0,38	0,75
Lippenlecken	2,17 \pm 2,92	2,33 \pm 2,70	0,64
Husten	0,11 \pm 0,47	0,39 \pm 0,78	0,31
Gähnen	0,33 \pm 0,77	1,17 \pm 1,86	0,05
Gesamt	9,72 \pm 5,28	11,11 \pm 3,83	0,20

Zudem wurde ein statistischer Vergleich der UAW-Scores zwischen den drei TRH-Tests ($n = 13$) durchgeführt. Beim globalen Vergleich mittels Friedman-Test ergaben sich hierbei keine statistisch signifikanten Unterschiede (Tab. 14).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tab. 14: UAW-Scores nach den drei TRH-Tests mit 2 µg/kg TRH (Mittelwert ± Standardabweichung); p-Werte mittels Friedman-Test

Symptom	Initial	Post Placebo	Post Therapie	p-Wert
Kauen	7,00 ± 2,38	9,00 ± 4,64	7,31 ± 2,95	0,69
Flehmen	0,08 ± 0,28	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,37
Lippenlecken	2,46 ± 2,99	2,85 ± 2,51	3,69 ± 3,54	0,22
Husten	0,08 ± 0,28	0,15 ± 0,55	0,15 ± 0,38	0,61
Gähnen	1,31 ± 2,06	1,08 ± 1,75	0,69 ± 1,25	0,64
Gesamt	10,9 ± 3,82	13,1 ± 6,51	11,9 ± 4,96	0,50

Die Darstellung der durchschnittlich erreichten Scores der jeweiligen Symptome pro Minute für die TRH-Dosis von 2 µg/kg und 0,5 µg/kg sind im Anhang (Tab. 27 und Tab. 28) aufgeführt. Die häufigsten Symptome waren Kauen, Lippenlecken und Gähnen. Bei der Dosis von 2 µg/kg TRH wurden in den ersten 2 Minuten alle fünf Symptome gezeigt, während in Minute 10, 11 und 15 keine unerwünschten Arzneimittelwirkungen dokumentiert wurden. Nach 0,5 µg/kg TRH hingegen fielen alle fünf Symptome nur in der zweiten Minute auf. Es gab keine Minute, in der alle Probanden frei von unerwünschten Arzneimittelwirkungen waren, was daran lag, dass „Kauen“ zu jedem Zeitpunkt gezeigt wurde. Die Symptome „Flehmen“ und „Husten“ kamen nur selten vor, wobei Letzteres ausschließlich in den ersten 2 (0,5 µg/kg) bzw. 3 (2 µg/kg) Minuten gezeigt wurde.

Die Häufigkeit des Vorkommens der Symptome ist in Tab. 15 aufgeführt. Das Symptom „Kauen“ wurde von allen 18 Probanden nach beiden Dosierungen gezeigt.

Vereinzelte traten seltenere Symptome auf, die nicht mit Scorepunkten bewertet wurden und somit nicht in die statistischen Berechnungen eingingen. Bei drei Pferden fielen „Zittern bzw. Zucken der Lippen bzw. Nüstern“ auf. Während dieses Symptom bei den Probanden 5 und 8 jeweils beim initialen TRH-Test mit 2 µg/kg TRH nur kurzzeitig innerhalb der ersten 3 Minuten vorkam, zeigte Proband 4 die Symptomatik nach 0,5 µg/kg TRH und 2 µg/kg TRH im Dosisvergleich und nach Placebo in häufigerer und längerer Ausprägung. Zudem fiel bei Proband 4 einmalig ein pumpender Atemtyp in der dritten Minute nach Verabreichung von 0,5 µg/kg TRH auf. Zwei Probanden zeigten

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

außerdem vereinzelt Scharren - Proband 18 nach der höheren und Proband 3 nach der niedrigeren TRH-Dosis.

Tab. 15: Anzahl der 18 Probanden, die innerhalb von 15 min nach TRH auffällige Verhaltensweisen zeigten

Symptom	0,5 µg/kg	2,0 µg/kg
Kauen	18	18
Flehmen	5	4
Lippenlecken	9	12
Husten	1	5
Gähnen	4	7
Schnauben	2	2
Zucken/Zittern der Lippen	1	3
pumpende Atmung	1	-
Scharren	1	1

3.2.5.2 Placebo-Phase

Während der Placebo-Phase berichtete kein Pferdebesitzer von klinischen Auffälligkeiten, die mit der Gabe in Zusammenhang zu bringen waren. Bei der tierärztlichen klinischen Untersuchung nach der Placebogabe gab es für die Autorin ebenfalls keine Hinweise auf klinische Veränderungen oder Symptome, die auf unerwünschte Wirkungen hinwiesen.

3.2.5.3 Pergolid-Phase

Während der Therapie mit Pergolid berichtete ebenfalls kein Besitzer von Auffälligkeiten, die eindeutig mit der Medikamentengabe zusammenhängen. Bei zwei Pferden (Proband 2 und 3) aus dem gleichen Stall, die zur gleichen Zeit mit Pergolid therapiert wurden, erwähnten die Besitzer kurze Phasen, in denen die Pferde Kotwasser zeigten. Dies war für eine Besitzerin in zeitlichen Zusammenhang mit der Fütterung einer kurzfasrigen Heucharge zu bringen. Außerdem zeigte Proband 2 am 06.04.2021, 16 Tage nach Start der Pergolidtherapie, kurzzeitige Kolihsymptome. Die Stute kolikte

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

vorberichtlich rezidivierend ca. alle drei Monate und die akute Kolik hing für die Besitzerin mit einem Wetterumschwung zusammen. Proband 3, ein 16-jähriger PRE Wallach, zeigte am 16.04.2021, 26 Tage nach Start der Pergolidtherapie, Hinweise auf einen akuten Infekt mit diffus geschwollenen distalen Gliedmaßen, Bewegungsunlust und Polyurie/Polydipsie (PU/PD). Erst dann berichtete die Besitzerin, dass die PU/PD mit einer Tränkeaufnahme von ca. 40 Litern in 24 Stunden für sie bereits ab ca. drei Tage nach Start der Therapie für insgesamt ca. vier Wochen auffällig war. Aufgrund der Symptomatik wurden Blut- und Harnuntersuchungen durchgeführt. Die Hämatologie und klinische Chemie ergaben lediglich einen leicht erhöhten Serum-Amyloid-A-Wert von 348 µg/ml. Harnstick und spezifisches Gewicht des Urins waren ohne von der Norm abweichende Befunde. Da der Wallach von ungestörtem Allgemeinbefinden war und kein Fieber zeigte, wurde die Pergolidtherapie fortgeführt und die angelaufenen Gliedmaßen durch Hydrotherapie und Bewegung symptomatisch therapiert. Die klinische Symptomatik war nach wenigen Tagen selbstlimitierend.

4 DISKUSSION

4.1 DISKUSSION DER METHODIK VON STUDIENTEIL 1: TRH-DOSISVERGLEICH

4.1.1 Diskussion des Studiendesigns des TRH-Dosisvergleichs

Der TRH-Dosisvergleich wurde als prospektive, randomisierte Cross-over-Studie aufgebaut. Dies hatte den Vorteil, dass aufgrund der intraindividuell vergleichbaren Daten eine vergleichsweise geringe Probandenanzahl ($n = 18$) nötig war, um statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Dosierungen herausfinden zu können. Das Hauptziel war, die übliche und empfohlene TRH-Dosierung von $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ mit $0,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ KGW im Hinblick auf die ACTH-Ausschüttungen zu vergleichen. Die höhere Dosierung wurde abgeleitet von den aktuellen Empfehlungen, dass Pferde unter 250 kg KGW $0,5 \text{ mg TRH}$ und Pferde über 250 kg KGW $1,0 \text{ mg TRH}$ erhalten sollen (Hart et al. 2023). Ursprünglich wurde TRH für die Bestimmung der Schilddrüsenfunktion beim Pferd verwendet. Hierbei wurde erstmals die Dosierung von 1 mg pro Pferd und $0,5 \text{ mg TRH}$ pro Pony dokumentiert (Lothrop und Nolan 1986). Obwohl es üblich ist, bei einem Großteil der bei Equiden eingesetzten Arzneimittel körperlsgewichtsbezogene Dosierungen zu verwenden, scheinen die genannten Empfehlungen festgelegt worden zu sein, ohne dass bisher – mit Ausnahme von Studien in der eigenen Arbeitsgruppe - Effekte von geringeren und an das Körpergewicht angepassten TRH-Dosierungen beim Pferd untersucht worden sind. Nach Kenntnis der Autorin verwendeten einzig Valencia et al. (2013) die individuell gewichtsbezogenen $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ TRH bei zwölf Stuten, um die daraus resultierenden Veränderungen mehrerer Hormone zu bestimmen.

Als möglicher Nachteil für die objektive Datenerhebung ist die fehlende Verblindung der Untersucherin hinsichtlich der TRH-Dosierungen zu erwähnen. Alle Untersuchungen wurden ausschließlich durch die Autorin in den jeweiligen Heimatställen der Probanden durchgeführt. Allerdings konnte die fehlende Verblindung auf die Hauptzielgröße ACTH, das in einem kommerziellen Labor bestimmt wurde, keinen Einfluss nehmen. Zu Bedenken bleibt, dass die Kenntnis der verabreichten TRH-Dosis die Bewertung der unerwünschten Arzneimittelwirkungen des TRHs beeinflusst haben könnte. Um diese

DISKUSSION

Befundung zu objektivieren, wurde aber strikt das durch die eigene Arbeitsgruppe entwickelte Score-System verwendet (Stallenberger 2020).

Alle 36 TRH-Stimulationstests wurden im Zeitraum zwischen dem 1. Dezember und 1. Mai in 2020, 2021 und 2022 durchgeführt. Der aktuell (2024) empfohlene Zeitraum zur Durchführung von TRH-Stimulationstests liegt zwischen Januar und Juni, da bekannt ist, dass die ACTH-Antwort auf das TRH im Herbst auch bei gesunden Pferden zu hohen Werten führen kann (Hart et al. 2023). Fünf Tests des ersten Studienteils (einer bei Proband 1 mit 0,5 µg/kg TRH, jeweils beide TRH-Dosierungen bei Proband 13 und 14) erfolgten im Dezember. Dies lag daran, dass in den damals gültigen Empfehlungen der EEG der Testzeitraum von Mitte November bis Mitte Juli angegeben wurde (Schott et al. 2019).

Ein Einfluss der Jahreszeit auf die ACTH-Antwort nach TRH-Gabe wurde in mehreren Studien nachgewiesen (Beech et al. 2007, Funk et al. 2011, Diez de Castro et al. 2014). Des Weiteren wurde bei sechs Pferden mit PPID und acht Kontrollpferden die Wiederholbarkeit des TRH-Tests im Winter in Australien überprüft. Hierfür wurde bei allen Pferden sowohl eine Woche vor als auch eine Woche nach der Wintersonnenwende (äquivalent in Deutschland mit dem 21./22. Dezember) ein TRH-Stimulationstest durchgeführt. Die Untersuchungen ergaben keinen Wocheneffekt und eine sehr gute Test-Retest-Wiederholbarkeit in diesem Zeitraum (Kam et al. 2021). Daher geht die Autorin davon aus, dass auch die Dezember-Ergebnisse der eigenen Studie verlässlich sind. Die Ergebnisse dieser fünf Probanden wurden speziell auf ungewöhnliche Verläufe geprüft, wobei keine Auffälligkeiten festgestellt wurden. Alle betroffenen Probanden (1, 13 und 14) wurden aufgrund ihrer erhöhten ACTH-Zehnminutenwerte (171, 273 und 125 pg/ml) auch in die Therapiestudie eingeschlossen.

Die Wash-out-Phase in der eigenen Studie zwischen den beiden TRH-Tests betrug zwischen 10 und 14 Tagen. Goodale et al. (2015) stellten bei dem Vergleich von zwei TRH-Formulierungen fest, dass eine Wash-out-Zeit von 24 Stunden zu kurz war. Ebenso zeigte Schorn (2019), dass bei Durchführung zweier TRH-Tests bei PPID-Patienten im Abstand von 48 Stunden die ACTH-Konzentrationen des zweiten Tests - unabhängig von der TRH-Dosierung - signifikant niedriger lagen als beim ersten Test. Demgegenüber

DISKUSSION

wies Stallenberger (2020) bei gesunden Pferden und Ponys nach, dass eine Wash-out-Phase von mindestens sechs Tagen ausreichend lang war. Sicherheitshalber wurde in der eigenen Studie ein Abstand von mindestens zehn Tagen zwischen den beiden TRH-Tests festgelegt. Die statistischen Berechnungen ergaben keinen signifikanten Einfluss der Reihenfolge der Tests, weshalb der Zeitraum offensichtlich lang genug gewählt war und davon auszugehen ist, dass auch bei den im Dezember durchgeführten Tests im Hinblick auf den Dosierungseffekt kein wesentlicher Einfluss bestanden hat. Andererseits sollten die Tests zeitlich nicht zu weit auseinander liegen, um saisonale Einflüsse oder auch jene möglicher Haltungs- bzw. Managementveränderungen zu minimieren. Daher wurde der maximale Testabstand in dieser Studie auf 14 Tage festgelegt.

4.1.2 Begründung für die Ein- und Ausschlusskriterien des TRH-Dosisvergleichs

In der eigenen Arbeitsgruppe wurden Reaktionen auf 1 oder 2 µg/kg TRH bereits bei gesunden (Stallenberger 2020) und eindeutig an PPID erkrankten Pferden (Schorn 2019) untersucht. In dem hier beschriebenen TRH-Dosisvergleich sollte ein breites Spektrum an Probanden eingeschlossen werden, bei denen ein TRH-Stimulationstest zur PPID-Diagnostik indiziert sein kann. Die PPID wird in den aktuellen Empfehlungen der British Equine Veterinary Association mit einer Prävalenz von 21–27 % bei mindestens 15 Jahre alten Pferden angegeben (Menzies-Gow et al. 2023). Das Alter von mindestens 15 Jahren stellt einen hochsignifikanten Risikofaktor ($p < 0,001$) für die Entwicklung einer PPID dar (McGowan et al. 2013). Daher wurde als Hauptkriterium für den Einschluss in die Studie ein Mindestalter von 15 Jahren festgelegt. Da bei Pferden mit klinisch offensichtlichen PPID-Symptomen - insbesondere einer generalisierten Hypertrichose - ein TRH-Stimulationstest nicht aus diagnostischen Gründen, sondern eher zur Therapiekontrolle genutzt werden soll, wurde das Symptom „Hypertrichose“ weder als zwingendes Ein- noch Ausschlusskriterium definiert.

Von der Teilnahme ausgeschlossen wurden trächtige Stuten, da möglichst viele Probanden der TRH-Dosisstudie auch in die folgende Therapiestudie eingeschlossen

DISKUSSION

werden sollten. Der Wirkstoff Pergolid wurde gemäß Packungsbeilage bisher nicht auf Unbedenklichkeit bei tragenden Stuten geprüft. Die Gabe von Pergolid bei tragenden und laktierenden Tieren kann das Risiko einer verlängerten Trächtigkeit, einer vorzeitigen Plazentaablösung oder einer reduzierten bzw. ausbleibenden Laktation erhöhen (Burns 2016). Studien zur Untersuchung des Effekts von Pergolid insbesondere bei älteren tragenden bzw. laktierenden Stuten sind nötig, um Risiken und Nutzen des nicht selten praktizierten Einsatzes solcher Dopaminagonisten bei diesen besser einschätzen zu können.

Es ist bekannt, dass Schmerzen über die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse zu einer vermehrten Ausschüttung von ACTH aus der Pars distalis der Hypophyse und damit auch von Cortisol aus der Nebenniere führen. Ayala et al. (2012) bestimmten bei 95 Pferden, die an verschiedenen Erkrankungen litten, die ACTH-Konzentrationen und verglichen sie mit 24 gesunden Kontrollen. Es ergaben sich hoch signifikante Unterschiede zwischen den ACTH-Werten der Kontrollgruppe ($23,2 \pm 2,7$ pg/ml), Hufrehepatienten ($64,5 \pm 7,7$ pg/ml, $n = 10$) und Pferden mit einem akuten abdominalen Syndrom ($55,0 \pm 7,7$ pg/ml, $n = 43$). Hingegen fanden Gehlen et al. (2020) heraus, dass Pferde ($n = 15$), die aufgrund von milden bis mäßigen Schmerzen unter analgetischer Therapie standen, keine signifikanten Erhöhungen der basalen und TRH-stimulierten ACTH-Konzentrationen (30 min nach TRH) im Vergleich zu neun Kontrollen aufwiesen. Die Probanden der eigenen Studie durften gleichwohl zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie keine Medikamente – insbesondere nicht-steroidale Antiphlogistika oder Analgetika – erhalten oder starke Schmerzen bzw. schwere Grunderkrankungen aufweisen.

4.2 DISKUSSION DER METHODIK VON STUDIENTEIL 2: THERAPIESTUDIE

4.2.1 Diskussion des Studiendesigns der Therapiestudie

Bei der Therapiestudie handelte es sich um eine prospektive, Placebo-kontrollierte und für die Pferdebesitzer verblindete Feldstudie zum Effekt von Pergolid auf basale und TRH-stimulierte ACTH-Werte. Aufgenommen wurden alle Probanden aus dem ersten Studienteil, die entsprechend der PPID Recommendations (Hart et al. 2023) in die Kategorie *PPID likely* oder *equivocal* fielen. Für die Einteilung wurde der ACTH-Zehnminutenwert aus dem TRH-Test mit der empfohlenen Dosierung von 2 µg/kg KGW verwendet.

Die Gabe von Placebo bzw. Pergolid erfolgte nicht randomisiert, da anhaltende Effekte des Pergolids nach Absetzen zu erwarten waren. Werden die Tabletten nach sechsmonatiger Therapie mit 1 bzw. 2 mg pro Tier und Tag abgesetzt, ließ sich bei sechs von sechs Pferden der Wirkstoff noch mindestens zwei Tage im Plasma nachweisen. Bei drei Tieren war das Pergolid für fünf Tage nach der letzten Gabe nachweisbar und bei einem Pferd sogar noch nach sieben Tagen (McFarlane et al. 2017). Um das Risiko eines Übertragungseffekts zu eliminieren, wurde daher zu Beginn der Studie festgelegt, dass immer erst das Placebo und anschließend das Pergolid verabreicht wurde. Dies hatte zur Folge, dass die Autorin als durchführende Person der Studie nicht verblindet war.

Das Haltings- und Fütterungsmanagement war bei den Probanden nicht einheitlich, da sie in ihren jeweiligen Heimatställen untergebracht waren und versorgt wurden. Die unterschiedlichen Managementbedingungen wurden als vorteilhaft angesehen, da die Probanden in dieser Hinsicht als repräsentativ für die Pferdepopulation im normalen Praxisalltag galten. Obwohl sich die verschiedenen Haltingsbedingungen nicht direkt vergleichen ließen, ist deren Einfluss auf die Studienergebnisse als sehr gering einzuschätzen, da die Auswertung der Ergebnisse ganz überwiegend intraindividuell erfolgte.

DISKUSSION

4.2.1.1 Diskussion der gewählten Therapiedauer

In der eigenen Studie sollten Placebo und Pergolid für mindestens vier und höchstens sechs Wochen gegeben werden, was auch gelang: So erfolgte die Gabe des Placebos über 35 ± 4 Tage (28-41 Tage) und die Gabe des Pergolids über 39 ± 3 Tage (34-42 Tage). Die Festlegung der Therapiedauer erfolgte auf Grundlage der Empfehlungen der Hersteller vom verwendeten Präparat Pergoquin® (WDT, Garbsen), nach denen endokrinologische Untersuchungen zur Dosiseinstellung und Therapieüberwachung nach vier bis sechs Wochen erfolgen sollen. Der zeitliche Spielraum von 28 bis 42 Tagen war nötig, um geeignete Termine festzulegen, da eine Testdurchführung vor Ort vormittags durchgeführt werden musste und ca. 3 Stunden dauerte.

Allerdings wurde in der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt, dass orale Pergolidgaben bereits nach 6, 12 und 30 dreißig Stunden zu signifikant ($p < 0,01$) niedrigeren ACTH-Werten im Vergleich zum Zeitpunkt 0 bei elf PPID-Patienten führten (Schorn 2019). Ähnliche Ergebnisse erhielten Rendle et al. (2019), die sechs an PPID erkrankte Pferde über 18 Tage einmal täglich mit $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ KGW Pergolid oral behandelten. Auch hier wiesen die basalen ACTH-Konzentrationen, die initial bei $104 (38/257) \text{ pg}/\text{ml}$ lagen, im Plasma bereits 12 Stunden nach der erstmaligen Gabe eine signifikante Reduktion auf, und sie fielen in den folgenden zehn Tagen weiter ab. Bei initial erhöhten basalen ACTH-Konzentrationen wurde daher ein Ansprechen auf das Pergolid bereits kurz nach Therapiebeginn mehrfach dokumentiert.

Im Rahmen der eigenen Therapiestudie sollte auch überprüft werden, ob sich das klinische Bild der Probanden bereits nach vier bis sechs Wochen Pergolidtherapie veränderte. Allerdings brauchen die meisten klinischen Veränderungen mutmaßlich länger bis sie erfassbar sind.

Einen Anhaltspunkt für die hierfür notwendige Therapiedauer geben Ergebnisse der Feldstudie zur Pergolidzulassung in den USA (NADA 141-331; 2011). Es wurden die Symptome Hirsutismus, Hyperhidrose, Polyurie/Polydipsie, Fettumverteilung und Muskelschwund bei 113 PPID-Patienten wiederholt bewertet. Hierzu wurden pro Symptom 0 bis maximal 3 Scorepunkte sieben Tage vor Therapiebeginn sowie an Tag 90

DISKUSSION

und 180 der Therapie vergeben (maximal erreichbarer Gesamtscore: 15). Als Einschlusskriterien für die Studie mussten die Pferde einen Hirsutismus-Score von mindestens 1 Scorepunkt (regionaler Hirsutismus) aufweisen sowie ein abnormes Ergebnis bei einem endokrinologischen Test auf PPID (Dexamethason-Suppressionstest: Cortisol $\geq 1 \mu\text{g/dl}$ oder basales ACTH $\geq 50 \text{ pg/ml}$) aufweisen. Der durchschnittliche Gesamtscore lag vor Therapiebeginn bei 4,90. Er fiel nach drei Monaten auf 3,31 und nach sechs Monaten auf 1,51. Nach 90-tägiger Pergolidgabe zeigten pro Symptom 21,2 % bis 36,3 % der Probanden eine Verbesserung. Mit 36,3 % war der Muskelschwund das Symptom, das sich am häufigsten verbesserte. Nach 180 Tagen wiesen sogar 89,2 % der Probanden bei dem Symptom Hirsutismus eine Besserung auf. Zudem zeigten 46 % eine Verbesserung des Muskelschwunds, 42,3 % eine Verbesserung der Hyperhidrose, 34,2 % eine Verbesserung der Polyurie/Polydipsie und 33,3 % eine Verbesserung der abnormen Fettverteilung. Die absoluten Anzahlen der Probanden, die initial mit den Symptomen Hyperhidrose, Polyurie/Polydipsie, abnorme Fettverteilung und Muskelschwund auffielen, wurden allerdings nicht angegeben (Andrews et al. 2011). Die Ergebnisse zeigen gleichwohl, dass positive Veränderungen des klinischen Bildes bereits nach drei Monaten detektierbar sind. Insofern wäre eine längere Behandlung in der eigenen Studie sicher wünschenswert gewesen. Allerdings hätte dies das Risiko einer abfallenden Besitzer-Compliance und möglicher Drop-outs deutlich erhöht. Da der Hauptzielparameter in den ACTH-Werten bestand, wurde die vier- bis sechswöchige Therapiedauer für ausreichend gehalten.

4.2.1.2 Diskussion der gewählten Tabletten

Der Wirkstoff Pergolid wurde in Form des Präparates Pergoquin® (WDT, Garbsen) verwendet. Es wurde dem einzigen anderen Präparat, welches zu Beginn der eigenen Untersuchungen im Jahr 2020 in Deutschland zugelassen war (Prascend®, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Ingelheim) vorgezogen, da die Pergoquin® Tabletten ohne Firmenaufdruck und in einer klassischen runden Form produziert wurden. So sollten die Tabletten für die Besitzer nicht als Verum identifizierbar sein.

DISKUSSION

Als Placebo kam das Präparat Biotin H forte 10 mg in Form von weißen runden Tabletten zum Einsatz (Abb. 2). Die Tabletten wiesen ebenso wie das Verum zwei Bruchkerben auf. Biotin ist auch bekannt als Vitamin B7 bzw. Vitamin H. Es gilt als wichtig unter anderem für die Entwicklung der Zellen, die für die Keratinsynthese verantwortlich sind. Demzufolge ist das Vitamin beim Pferd vor allem für die Hufhornqualität relevant. Im Lehrbuch „Pferdefütterung“ (Meyer et al. 2014) im Kapitel „Energie-, Nährstoff- und Strukturstoffbedarf“ erwähnen Coenen und Meyer (2014), dass Pferde aufgrund der enteralen Eigensynthese als gut mit Biotin versorgt gelten und eine zusätzliche Substitution generell nicht notwendig sei. Gleichwohl geben Vervuert und Meyer (2014) im Kapitel „Fütterungsempfehlungen bei Krankheiten und Störungen“ an, dass eine tägliche, langfristige Zufütterung von 3 mg / 100 kg Körpergewicht bei Problemen wie sprödem Hufhorn, Hornspalten und -rissen helfen soll. Es gibt mehrere Studien, die eine Verbesserung der Hornqualität bei Pferden nach mehrmonatiger Supplementierung von Biotin festgestellt haben, allerdings wurden dabei höhere Biotindosierungen angewandt. Wintzer (1986) stellte bei bis zu zehn Monate dauernden Untersuchungen bei 15 Pferden, die täglich 3,1 – 3,7 mg Biotin / 100 kg Körpergewicht erhielten, eine verbesserte Hufhornqualität fest. Darüber hinaus wurde einige Jahre später gezeigt, dass sich bei 97 Pferden, die ein bis sechs Jahre 3,3 – 5,0 mg Biotin / 100 kg Körpergewicht täglich erhielten, im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 11) nach 8 bis 15 Monaten ebenfalls eine Verbesserung der Hornqualität einstellte (Geyer und Schulze 1994). Weitere Studien, in denen spezielle Zusatzfuttermittel mit nochmal höheren Biotindosierungen verfüttert wurden, weisen auf eine signifikant höhere Wachstumsrate des Hufhorns nach mehrmonatiger Supplementierung hin (Reilly et al. 1998, Jančíková et al. 2012). In den genannten Studien wurden keine unerwünschten Wirkungen des Biotins erwähnt. Das in der eigenen Studie verwendete Präparat Biotin H forte enthielt 10 mg Biotin pro Tablette. Je nach Proband betrug die Biotin Dosierung zwischen 1,7 und 2,5 mg Biotin pro 100 kg Körpergewicht und Tag und lag somit unter den oben genannten Dosierungen. Da die Probanden die Biotintabletten für maximal sechs Wochen erhielten, wurde nicht von einem erkennbaren Effekt auf die Hornqualität ausgegangen. Nach Kenntnisstand der Autorin gibt es bislang keine

DISKUSSION

Hinweise auf eine Toxizität des Biotins, zumal ein Überschuss renal ausgeschieden wird (Reilly et al. 1998). Andere Wirkweisen der Biotintabletten, die die Studienergebnisse hätten beeinflussen können, sind der Autorin nicht bekannt, weshalb die Biotin H forte Tabletten als geeignetes Placebo angesehen wurden.

Die der Studie vorangegangene Suche nach einem Placebo, das optisch den Pergoquin® Tabletten möglichst ähnlich war, hatte sich aufgrund ihrer rosa Farbe schwierig gestaltet. Christen et al. (2018) führten eine Placebo-kontrollierte Studie zum Einfluss von Pergolid auf die Ausscheidung von Strongylideneiern bei an PPID erkrankten Pferden durch und nutzten für die Placebo-Gruppe optisch identische Prascend® Tabletten ohne Wirkstoff der Firma Boehringer Ingelheim Vetmedica (Ingelheim). Diese Placebos konnten für die eigene Studie nicht produziert werden. Nach Kenntnis der Autorin ist bislang nur eine weitere Studie veröffentlicht, in der Pergolideffekte beim Pferd Placebo-kontrolliert untersucht wurden (Banse et al. 2021). Hierbei wurde der Einfluss des Medikamentes auf Muskelatrophien bei an PPID erkrankten Pferden bestimmt. Als Placebo wurden 0,15 mg/kg Dextrose oral verabreicht (Banse et al. 2021). Die in der eigenen Studie verwendeten weißen Biotin H forte Tabletten wichen zwar farblich vom Verum ab, aber sie besaßen eine runde Form und zwei Bruchkerben und sollten dem Besitzer ein Arzneimittel-typisches Aussehen suggerieren. Einige Tierhalter waren beruflich im tiermedizinischen Bereich tätig, weshalb nicht auszuschließen ist, dass diese das Verum erkannten. Da subjektive Eindrücke der Besitzer zwar dokumentiert, aber nicht weiter ausgewertet wurden, ist kein Einfluss dieser möglichen Kenntnis auf die hier präsentierten Ergebnisse zu erwarten.

4.2.2 Begründung für die Ein- und Ausschlusskriterien der Therapiestudie

Für die Teilnahme an der Therapiestudie galten generell die gleichen Kriterien wie beim TRH-Dosisvergleich (Kap. 4.1.2). Zusätzlich war es nötig, dass die Probanden nach 2 µg/kg TRH einen mit dem Immulite® 2000 XPI bestimmten ACTH-Zehnminutenwert von mindestens 100 pg/ml aufwiesen. Sie mussten laut aktueller Empfehlungen anhand ihrer ACTH-Konzentration in die Kategorie *Interpretive Zone* (ACTH: 100-200 pg/ml) oder

DISKUSSION

PPID likely (ACTH > 200 pg/ml) fallen (Hart et al. 2023). Adams et al. (2023) ermittelten in ihrer Studie hingegen präzisere Grenzwerte. Sie führten bei 63 Pferden (17 Kontrollen, 21 Pferde mit subklinischer PPID und 25 mit klinischer PPID) über ein Jahr monatliche TRH-Tests durch. Die medianen ACTH-Konzentrationen 10 Minuten nach TRH-Gabe lagen in allen drei Gruppen im Dezember höher als im Januar. Es wurden monatliche diagnostische Cut-off-Werte für die ACTH-Zehnminutenwerte vom Youden-Index abgeleitet. Hierbei ergab sich ein diagnostischer Cut-off-Wert von 172 pg/ml für Dezember und 159 pg/ml für Januar. Demnach wären Proband 1 (TRH-Test mit 2 µg/kg im Januar) und Proband 13 (TRH-Test mit 2 µg/kg im Dezember) ebenfalls anhand ihrer ACTH-Zehnminutenwerte positiv getestet worden. Bei Proband 14 lag der ACTH-Zehnminutenwert nach 2 µg/kg TRH am 01.12.2021 lediglich bei 125 pg/ml und somit unterhalb des Cut-off-Wertes von 172 pg/ml für Dezember. Demnach wäre Proband 14 fälschlicherweise in die Therapiestudie aufgenommen worden. Klinisch gab es bei dem 15 Jahre alten Wallach bis auf eine geringgradige Muskelschwäche an Rücken und Bauch keine Auffälligkeiten einer PPID und er zeigte weder Veränderungen im Haarkleid noch Fellwechselstörungen. Allerdings gilt es zu beachten, dass in der Studie von Adams et al. (2023) die Analyse der ACTH-Konzentrationen mittels Immulite® 1000 durchgeführt wurde, welcher im Vergleich zum in dieser Studie verwendeten Immulite® 2000 XPi etwas höhere Werte misst. Somit wären die Immulite® 2000 XPi Cut-offs etwas niedriger anzusetzen. Gleichwohl könnte Proband 14 mit seinen subtilen klinischen Zeichen und dem ACTH-Zehnminutenwert von 125 pg/ml zu Unrecht in die *Interpretive Zone* gefallen sein und hätte im Nachhinein nicht in die Therapiestudie aufgenommen werden dürfen. Dennoch gibt es keinen Hinweis darauf, dass die Testergebnisse von Proband 14 die Geamtergebnisse der Studie weniger valide gemacht haben könnte, da er mit dem erwarteten Abfall seiner ACTH-Konzentrationen nach Pergolid reagiert hat und es bisher keine überzeugenden Daten dazu gibt, dass der Dezember unzuverlässige Ergebnisse des TRH-Tests liefert. Des Weiteren war es notwendig, dass die Probanden im Equidenpass als Nicht-Schlachtpferd eingetragen waren bzw. die Besitzer bereit waren, den Status entsprechend umtragen zu lassen, da der Wirkstoff Pergolid nur für nicht lebensmittelliefernde Tiere zugelassen ist.

4.3 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

4.3.1 Diskussion der Studiendurchführung

Alle 18 Probanden des TRH-Dosisvergleichs durchliefen den ersten Studienteil vollständig. Es wurden 13 dieser Probanden in die Therapiestudie aufgenommen und alle schlossen den zweiten Studienteil ab. Es gab somit keine Drop-outs oder für den zweiten Studienteil neu zu rekrutierenden Probanden.

Die Untersuchungen einschließlich der TRH-Stimulationstests wurden bei allen Pferden und Ponys in ihren jeweiligen Heimatställen durchgeführt, sodass keine Transporte und Umgebungswechsel für die Tiere nötig waren. Somit konnte ein potentieller Einfluss dieser Stressoren auf die Ergebnisse verhindert werden. Denn es wurde bereits mehrfach der Einfluss von Stress im Zusammenhang mit Transportfahrten oder neuen Umgebungsreizen bei Pferden untersucht und regelmäßig ließen sich erhöhte basale ACTH-Ausschüttungen nachweisen (Hada et al. 2003, Fazio et al. 2008, Fazio et al. 2016). Ein weiterer Grund, die Tests nicht in der Klinik durchzuführen bestand darin, dass kaum ein Besitzer bereit gewesen wäre, sein Tier mehrfach in die Klinik zu bringen. Letztlich wird die diagnostische Testung in praxi auch im Heimatstall durchgeführt und das Vorgehen hatte somit den Vorteil, dass die eigenen Ergebnisse auf die Situation im Feld übertragbar waren.

Um die korrekte TRH-Dosis zu ermitteln, wurde das Körpergewicht der Probanden einmalig initial bestimmt. An den beiden Tagen des TRH-Dosisvergleichs, die maximal 14 Tage auseinander lagen, wurde das gleiche Körpergewicht zur Dosisberechnung verwendet. Aufgrund des vier- bis sechswöchigen Abstandes zwischen den Untersuchungen in der Therapiestudie wurde das aktuelle Gewicht erneut nach der Placebo- bzw. Pergolid-Phase ermittelt. Die Körpergewichtsbestimmung erfolgte bei 17 der 18 Probanden mittels Spiller Pferdemaßband. Nur bei Proband 1, dem klinikeigenen Pferd, stand für jede Gewichtsbestimmung eine Pferdewaage zur Verfügung.

Alle TRH-Tests verliefen wie geplant. Im Rahmen der Voruntersuchungen wurde bereits die Reaktion der Probanden auf eine Venenpunktion überprüft. Das Legen des Venenverweilkatheters konnte bei allen Pferden ohne Zwangsmaßnahmen

DISKUSSION

durchgeführt werden und kein Pferd zeigte dabei deutlich abwehrendes oder ängstliches Verhalten. Die Untersuchungen von Fouché et al. (2015) bei 15 PPID-verdächtigen Pferden ergaben, dass eine Venenpunktion zu keinem statistisch signifikanten bzw. diagnostisch relevanten Anstieg der ACTH-Konzentrationen führte. Dennoch wurde in der eigenen Studie zwischen dem Legen des Venenverweilkatheters und der ersten Blutprobenentnahme mindestens 15 Minuten gewartet, um einen möglichen Einfluss vom Stress der Manipulationen auf die ACTH-Werte möglichst gering zu halten.

Die in EDTA-Monovetten gewonnenen Blutproben für die ACTH-Messungen wurden bis zur weiteren Aufbereitung mittels Icepacks in einer Styroporbox gekühlt. In einer Studie, die Effekte des Probenhandlings auf ACTH-Konzentrationen im equinen Plasma untersuchte, wiesen die ACTH-Werte bei 22 °C Lagerungstemperatur einen signifikanten Abfall im Zeitraum zwischen 4 und 8 Stunden auf (Rendle et al. 2015). Des Weiteren stellten Prutton et al. (2015) fest, dass die ACTH-Konzentrationen in Blutproben in den ersten 4 bis 8 Stunden bei 4 bzw. 21 °C keine signifikanten Änderungen aufweisen. Allerdings vermindern sie sich nach 24 Stunden signifikant, wobei der Abfall bei 21 °C stärker ausfiel als bei 4 °C. Aufgrund der Kühlung der eigenen EDTA-Proben, die innerhalb von maximal 4 Stunden weiter aufbereitet wurden, sollten demnach die ACTH-Konzentrationen stabil geblieben sein.

Nach Zentrifugation und Plasmagewinnung wurden die eigenen Proben bei -20 °C gelagert und nach maximal 7 Tagen im gefrorenen Zustand direkt an das Labor versendet. Auch hierzu gibt es methodische Untersuchungen, die annehmen lassen, dass sich die ACTH-Konzentrationen im eigenen Material präanalytisch nicht verändert haben. So führte das einmalige Einfrieren von EDTA-Plasmaproben bei -20 bzw. -80 °C über 30 Tage vor der Messung zu keiner signifikanten Veränderung der ACTH-Konzentrationen (Prutton et al. 2015). Allerdings lösen mehrere Einfrier-Auftau-Zyklen eine signifikante ACTH-Reduktion ($p = 0,001$) aus (Hu et al. 2020).

Die Blutproben für die Insulinmessungen wurden in Serum-Monovetten entnommen und für maximal 4 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurden sie wie die EDTA-Proben verarbeitet und versendet. Die Lagerung von Vollblut- oder

DISKUSSION

Serumproben bei Raumtemperatur bis zu 72 Stunden besitzt keinen klinisch signifikanten Effekt auf die Insulinkonzentrationen (Carslake et al. 2016). Daher sollte das präanalytische Vorgehen keinen Einfluss auf die Insulinkonzentrationen gehabt haben.

Die Hormonbestimmungen erfolgten in Routineverfahren bei Biocontrol (Bioscientia Healthcare GmbH, Ingelheim) mit dem Immulite® 2000 XPI Immunoassay-Analysesystem (ACTH) bzw. ADVIA Centaur® XP Immunoassay System (Insulin). Kalibrierungen und Geräteüberwachungen werden von geschultem Laborpersonal durchgeführt, weshalb dies hier nicht weiter diskutiert wird.

Aufgrund der mehrwöchigen Dauer der Therapiestudie in den unterschiedlichen Heimatställen konnte die tägliche orale Verabreichung des Placebos bzw. Verums nicht durch die Autorin selbst durchgeführt werden. Die Eingabe erfolgte durch die zuvor genau eingewiesenen jeweiligen Pferdebesitzer. Die korrekte Verabreichung konnte gleichwohl nicht überwacht werden und beruhte auf einem Vertrauensverhältnis. Keiner der Pferdebesitzer berichtete von Schwierigkeiten bei der Eingabe und die ausgehändigten Tablettendosen wurden im geleerten Zustand wieder zurückgegeben.

4.3.2 Diskussion der Probandenauswahl

4.3.2.1 Diskussion des Signalements

Es nahmen insgesamt 18 Pferde und Ponys an der Studie teil, wobei keine Rasse- oder Geschlechtskriterien festgelegt wurden. Es gibt Hinweise darauf, dass sowohl Araber als auch Shetlandponys, Welsh Rassen und auch Ponys anderer Rassen im Herbst zum Teil signifikant höhere basale ACTH-Konzentrationen im Vergleich zu anderen Pferderassen aufweisen (Durham et al. 2022, Bamford et al. 2023). In der eigenen Studie waren viele verschiedene Pferderassen sowie Kreuzungen vertreten (Tab. 3). Da die TRH-Tests nicht im Herbst durchgeführt wurden und die statistischen Auswertungen ganz überwiegend auf intraindividuellen Vergleichen beruhten, scheint es unwahrscheinlich, dass die Ergebnisse durch die verschiedenen Rassen beeinflusst wurden.

DISKUSSION

Für die eigene Studie wurden ausschließlich mindestens 15 Jahre alte Probanden ausgewählt, da diese ein erhöhtes Risiko aufweisen, an einer PPID zu erkranken. Welsh et al. (2016) geben ein medianes Alter von 21 Jahren (Interquartilsabstand: 15 – 26 Jahre) zum Zeitpunkt einer PPID-Diagnosestellung an. McGowan et al. (2013) verglichen 69 alte (≥ 15 Jahre) Pferde mit PPID mit 256 alten (≥ 15 Jahre) Kontrollen. Die Diagnose PPID wurde anhand basaler ACTH-Konzentrationen gestellt. Sie fanden mittels uni- und multivariabler Analyse heraus, dass das Alter einen Risikofaktor darstellt, an einer PPID zu erkranken (odds ratio 1,18; 95 % Konfidenzintervall 1,11 – 1,25, $p < 0,001$). Die Altersspanne der eigenen 18 Probanden betrug 15 bis 29 Jahre ($19,9 \pm 4,1$ Jahre). Das durchschnittliche Alter der 13 Pferde, die an der Therapiestudie teilnahmen, war mit $19,8 \pm 4,5$ Jahren nahezu identisch. Da nicht nur klinisch eindeutig bereits an PPID erkrankte Pferde und Ponys in die Therapiestudie eingeschlossen werden sollten, ist es erklärlich, dass die eigenen Probanden etwas jünger waren als die PPID-Patienten mit erhöhten basalen ACTH-Werten in der Studie von Welsh et al. (2016).

Das Geschlecht scheint nicht mit einer PPID assoziiert zu sein (Ireland und McGowan 2018), weshalb es keinen Risikofaktor für die Erkrankung darstellt (McGowan et al. 2013). In der eigenen Studie nahmen zehn Wallache und acht Stuten am TRH-Dosisvergleich teil und davon sieben Wallache und sechs Stuten an der Therapiestudie.

Bei den Probanden handelte es sich um eine gemischte Feldpopulation, wie Tierärzte sie in praxi erleben. Aufgrund der insgesamt kleinen Probandenanzahl lassen sie sich aufgrund ihrer Diversität schwer miteinander vergleichen. Da die biometrische Planung der beiden Studienteile hauptsächlich auf intraindividuellen Vergleichen basierte, kann gleichwohl davon ausgegangen werden, dass aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden konnten.

4.3.2.2 Diskussion der Vorerkrankungen

Durch die Besitzerbefragungen und klinischen Untersuchungen wurden bei fast allen Pferden Vorerkrankungen ermittelt. In einer großen Studie, die die Prävalenz chronischer Erkrankungen in der generellen Pferdepopulation des Vereinigten

DISKUSSION

Königreiches ermittelte ($n = 70.477$), wiesen 13 % mindestens eine chronische Erkrankung auf. Die häufigsten waren Hufrehe (6 %), PPID (3 %), Sarkoide (3 %), Osteoarthritis (2 %), Recurrent Airway Obstruction (2 %) und Neoplasien (1%) (Welsh et al. 2016). In der eigenen Studie wies ein Teil der Probanden ebenfalls die genannten Erkrankungen auf, wie z.B. chronisch obstruktive Bronchitis, orthopädische Probleme, Hufrehe und Melanome. Im Patientengut gab es darüber hinaus Probanden mit Herzklappeninsuffizienzen, chronischen oder rezidivierenden Magen-Darm- und Hauterkrankungen oder einem einseitigen Anophthalmus. Ayala et al. (2012) fanden heraus, dass chronische, mit Schmerzen assoziierte orthopädische Erkrankungen wie z.B. degenerative Gelenkerkrankungen oder eine atlanto-okzipitale Luxation bei 22 Pferden zu signifikant höheren ACTH-Werten ($40,9 \pm 9,5$ pg/ml) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($23,2 \pm 2,7$ pg/ml, $n = 24$) führten. Da keiner der eigenen Probanden klinische Anzeichen von Schmerzen zeigte und keine Hinweise bestanden, dass die Symptome das Allgemeinbefinden der Probanden beeinträchtigten, wurde davon ausgegangen, dass die Vorerkrankungen keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die Studienergebnisse besitzen.

4.3.2.3 Diskussion der labordiagnostischen Voruntersuchungen

Die hämatologischen und klinisch-chemischen Werte vor Beginn der Studie ergaben bei fünf Probanden leichte Abweichungen bei einzelnen Blutvariablen (Anhang Kap. 8.3.2). Diese wurden nach Überprüfen der klinischen Relevanz bzw. dem Durchführen von Kontrollmessungen als derart geringgradig angesehen, dass alle Fünf in die Untersuchungen eingeschlossen wurden.

4.3.2.4 Diskussion der klinischen Untersuchungsergebnisse

Die klinischen Voruntersuchungen ergaben bei 14 Pferden leichte Abweichungen vom Physiologischen wie z.B. Nasen- oder Augenausfluss, vergrößerte Mandibularlymphknoten, verschärfte Lungengeräusche, ein Herzgeräusch oder Hautveränderungen (Anhang Tab. 23). Alle Symptome wurden als gering- bis

DISKUSSION

mittelgradig eingestuft. Das Allgemeinbefinden der Pferde war nicht gestört. Es zeigten sich keinerlei akute Entzündungsanzeichen oder Schmerzen. Die auffälligsten Veränderungen zeigte Proband 18, ein Schimmel, bei dem multiple Umfangsvermehrungen in der Haut sichtbar waren. Diese Fellfarbe prädisponiert für melanozytäre Tumoren mit einer Häufigkeit von bis zu 80 % bei Schimmeln über 15 Jahren (Phillips und Lembcke 2013, Pimenta et al. 2023). Aufgrund der Fellfarbe und der typischen Lokalisation insbesondere an der Schweifröhre wurde mit großer Wahrscheinlichkeit auf Melanome geschlossen. Die Umfangsvermehrungen schienen dem Pferd zum Zeitpunkt des Studieneintritts keine Schmerzen zu bereiten. Dennoch berichtete die Besitzerin während des Studienzeitraums gelegentlich von Auffälligkeiten beim Kotabsatz in Form von Pressen oder Stöhnen. Dieses Verhalten wurde von der Autorin an den Studientagen nicht beobachtet.

Die klinischen Untersuchungen im weiteren Studienablauf ergaben bei den Probanden zum Teil über die in den Voruntersuchungen erhobenen Befunde hinausgehende Symptome (Anhang Tab. 26). Diese waren nie so ausgeprägt, dass sie zu einem gestörten Allgemeinbefinden führten. Insgesamt wurden die klinischen Befunde als geringgradig und als in einer Feldpopulation zu erwarten interpretiert. Es war nicht davon auszugehen, dass sie auf die ACTH-Spiegel bzw. Ergebnisse der TRH-Tests einen Einfluss nahmen.

Die Bewertung der vorberichtlichen Angaben und der klinischen Untersuchungen mittels des Score-Systems (Anhang Kap. 8.1) erfolgte problemlos. Da als Einschlusskriterium hauptsächlich das Alter von mindestens 15 Jahren bestand, ergab sich eine weite Punkteverteilung im initialen Gesamtscore von 3 – 22 Punkten. Die schwach positiven Korrelationen zwischen „Mattigkeit Ausprägung“ und „Mattigkeit Dauer“ mit den ACTH-Basalwerten könnten darauf hinweisen, dass basal höhere Konzentrationen von ACTH und damit möglicherweise auch anderen POMC-Produkten zu einem gedämpften Allgemeinbefinden führen. Es ergaben sich keine Korrelationen zwischen den Scores und den initialen ACTH-Zehnminutenwerten nach TRH.

Auch Pichon und Gehlen (2017) konnten im Gesamtvergleich keine Korrelation zwischen basalen ACTH-Werten und ihrem PPID-Score feststellen. Bei den einzelnen Symptomen

DISKUSSION

wiesen lediglich „Zunahme von Kruppen- und Kammfett“ und Ausbildung eines „lockigen Fells“ einen statistisch signifikanten Zusammenhang ($p = 0,04$ und $p = 0,0001$) zu den ACTH-Basalwerten auf. Allerdings fand sich eine hohe statistische Signifikanz zwischen den ACTH-Konzentrationen und dem PPID-Score, wenn die jahreszeitlichen Cut-offs überschritten waren. Dies war bei keinem eigenen Probanden der Fall – die Spannweite der basalen ACTH-Konzentrationen und die Ausprägung der klinischen Symptome war in der eigenen Population vergleichsweise gering. Dies dürfte auch die fehlenden Korrelationen erklären.

Unbefriedigend war, dass sich die Scores nach Placebo und nach Pergolid kaum unterschieden. Dabei ist zu bedenken, dass die meisten Probanden der Therapiegruppe klinisch nicht stark auffällig waren und die generalisierte Hypertrichose als pathognomonisches Symptom nicht in den Score einging. Für eine statistisch detektierbare Verbesserung der anderen klinischen Symptome mag eine längere als die erfolgte maximal sechswöchige Pergolidgabe erforderlich sein.

4.3.2.5 Diskussion des PPID-Status der Probanden bei Studieneinschluss

Die Probanden wurden aufgrund ihres Mindestalters von 15 Jahren und unabhängig vom Auftreten klinischer PPID-Symptome in die Studie eingeschlossen. Viele Probanden zeigten daher nur milde oder unspezifische Krankheitssymptome. So zeigten 7 der 18 Probanden keinerlei Auffälligkeiten im Haarkleid oder Fellwechsel. Von den restlichen elf Probanden wiesen drei eine generalisierte und zwei eine regionale Hypertrichose auf (Tab. 4). Der klinische Gesamtscore lag initial bei allen Probanden zwischen 3 und 22 Punkten (Tab. 5).

Der TRH-Stimulationstest soll vor allem bei unklaren Fällen wie z.B. Pferden mit klinischen Symptomen, aber unauffälligem ACTH-Basalwert, zum Einsatz kommen (Hart et al. 2023). Die Probanden der eigenen Studie stellten sich somit als gute Studienpopulation zur Untersuchung des TRH-Stimulationstests heraus, da die ACTH-Basalwerte initial bei maximal 35 pg/ml lagen - bei 3 Probanden im *PPID unlikely* Bereich und bei 15 Probanden in der *Interpretive Zone*. In der Realität basiert allerdings die

DISKUSSION

Entscheidung, eine Therapie mit Pergolid zu beginnen, oft hauptsächlich auf den ACTH-Werten, die 10 Minuten nach 2 µg/kg TRH erreicht werden (Tab. 7). Vermutlich wäre bei einem Teil der eigenen Probanden aufgrund mangelnder oder zu geringer klinischer Auffälligkeiten ohne eine Studienteilnahme keine PPID-Diagnostik durchgeführt worden. Umso erstaunlicher ist es, dass bei fünf der acht Probanden ohne regionale oder generalisierte Hypertrichose trotzdem positive Ergebnisse in beiden TRH-Tests entstanden.

4.3.3 Diskussion der ACTH-Werte im TRH-Dosisvergleich

Es wurde in der eigenen Arbeitsgruppe bereits gezeigt, dass sich die halbierte TRH-Dosis von 1 µg/kg KGW im Vergleich zu 2 µg/kg KGW hinsichtlich der ACTH-Konzentrationen bei gesunden und an PPID erkrankten Pferden nicht signifikant unterschied (Schorn 2019, Stallenberger 2020). Die auf diesen Ergebnissen basierende Hypothese, dass 0,5 µg/kg TRH im Vergleich zu 2,0 µg/kg TRH zu niedrigeren ACTH-Ausschüttungen führt, konnte statistisch größtenteils nicht bestätigt werden, denn auch die ACTH-AUCs, ACTH-Basal-, Zehnminuten- und Maximalwerte nach diesen beiden TRH-Dosierungen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Anders war es einzig bei den ACTH-Werten 30 Minuten nach TRH-Injektion, bei denen die niedrigere TRH-Dosierung signifikant niedrigere ACTH-Werte auslöste im Vergleich zu 2 µg/kg TRH. Somit scheint ein Viertel der üblichen TRH-Dosis ausreichend, um anhand der ACTH-Zehnminutenwerte den PPID-Status bestimmen zu können.

4.3.3.1 Diskussion der ACTH-Verläufe im TRH-Dosisvergleich

Die individuellen ACTH-Konzentrationen unterschieden sich deutlich zwischen den Probanden. Dennoch ließ sich bei einem Großteil, bei 14 der 18 Probanden, ein klassischer, zu erwartender ACTH-Kurvenverlauf erkennen. Dieser ist gekennzeichnet durch einen raschen, steilen ACTH-Anstieg nach TRH-Gabe mit ACTH-Peak bei der ersten Messung nach 5 Minuten, gefolgt von einem raschen Abfall in den nächsten 10 Minuten, der dann weiter in einen moderaten, konstanten Abfall der ACTH-Konzentrationen

DISKUSSION

übergeht bis die ACTH-Werte 60 Minuten nach der TRH-Injektion fast wieder im Ausgangsbereich liegen.

Beim Vergleich der beiden TRH-Dosierungen wurden bei sieben Probanden intraindividuell sehr ähnliche ACTH-Verlaufskurven festgestellt. Bei fünf Pferden löste die TRH-Dosis von 0,5 µg/kg im Vergleich zu 2 µg/kg niedrigere ACTH-Konzentrationen aus und bei drei Probanden war es umgekehrt. Vier Probanden (Proband 4, 5, 7 und 16) wiesen zum Teil abweichende Kurvenverläufe auf, die meistens durch einen zweiten späteren ACTH-Anstieg zu unterschiedlichen Zeitpunkten gekennzeichnet waren.

Bei Proband 5 gab es nach dem TRH-Test mit 2 µg/kg TRH bereits nach 10 Minuten so niedrige Werte, dass eine Fehlmessung angenommen werden musste: Die ACTH-Werte betragen nach 0, 5, 10, 15 und 30 Minuten 14, 128, 18, 20 und 19 pg/ml. Deshalb wurden für diesen Testtag die ACTH-Werte erneut mittels der aservierten, gefrorenen Rückstellproben ermittelt. Die Messung ergab einen üblichen ACTH-Kurvenverlauf (Abb. 12). Es wurde mit dem Labor Kontakt aufgenommen und kein technischer Fehler festgestellt. Bei der Durchführung von Doppelmessungen seien laut Labor ca. 10 % Abweichungen der ACTH-Konzentrationen realistisch. Um zu kontrollieren, wie groß ein möglicher Einfluss des Tiefgefrierprozesses war, wurden auch die Rückstellproben des Tests nach 0,5 µg/kg TRH des gleichen Probanden bestimmt. Bis auf die 5-Minuten-Probe nach 0,5 µg/kg TRH, in der der ACTH-Wert um 17 % von 177 auf 151 pg/ml abgefallen war, wiesen die restlichen ACTH-Konzentrationen eine Reduktion von 0 - 7 % im Vergleich zu den initial gemessenen Blutproben auf und waren somit gut vergleichbar. Demnach erschien die Nachmessung aus den gefrorenen Rückstellproben valide, sodass für Proband 5 die Ergebnisse für den TRH-Test mit 2 µg/kg aus den Rückstellproben in die Auswertung gingen.

4.3.3.2 Diskussion der ACTH-Basalwerte im TRH-Dosisvergleich

Der Wert basaler ACTH-Konzentrationen für die PPID-Diagnostik wurde bisher in vielen Studien mit sehr unterschiedlichen Studiendesigns und -populationen bei Pferden untersucht. Auf dieser Grundlage wurden in zwei systematischen Reviews eine mediane

DISKUSSION

Sensitivität und Spezifität von 75,5 % und 92,5 % (Tatum et al. 2021) bzw. eine durchschnittliche (mean) Sensitivität und Spezifität von 72 % und 88 % (Meyer et al. 2022) für das basale ACTH berechnet. Aufgrund der aktuellen Studienlage scheint die basale ACTH-Konzentration geeigneter, um eine PPID auszuschließen als diese zu diagnostizieren, insbesondere solange die klinischen Symptome nicht stark ausgeprägt sind.

Die ACTH-Basalwerte der eigenen Studie zeigten im intra- und interindividuellen Vergleich nur geringe Unterschiede. Es lag kein Basalwert über dem saisonal festgelegten Cut-off-Wert von 40 pg/ml (Dezember bis Juni) für die Kategorie *PPID likely* (Hart et al. 2023), obwohl 3 der 18 Probanden eine generalisierte Hypertrichose aufwiesen und 10 Probanden anhand ihrer ACTH-Zehnminutenwerte als *PPID likely* klassifiziert wurden. Während 14 Probanden an beiden Testtagen des TRH-Dosisvergleichs basale ACTH-Werte in der *Interpretive Zone* zwischen 15 und 40 pg/ml aufwiesen, zeigten die anderen vier Probanden auch Ergebnisse mit Werten < 15 pg/ml, also in der Kategorie *PPID unlikely*. Proband 3 und 17, beide mit Auffälligkeiten des Haarkleids bzw. Fellwechsels, wiesen vor beiden Tests basale ACTH-Werte in der Kategorie *PPID unlikely* auf, obwohl sie im Rahmen des TRH-Stimulationstests mit 2 µg/kg TRH als positiv kategorisiert wurden. Diese Ergebnisse passen sehr gut zur Aussage von Horn et al. (2021), dass der TRH-Stimulationstest (allerdings bezogen auf die ACTH-Dreißigminutenwerte) die Test-Genauigkeit („test accuracy“) im Vergleich zur alleinigen Bestimmung des basalen ACTH-Wertes verbessert (von $0,91 \pm 0,06$ zu $0,97 \pm 0,03$, $p = 0,004$).

Bei Proband 4 war die Differenz zwischen den beiden basalen ACTH-Werten mit 11 und 35 pg/ml am größten. Die 22-jährige Tinkerstute zeigte eine generalisierte Hypertrichose und wurde im Februar getestet. Auf Grundlage mehrerer Studien (Miller et al. 2008, McFarlane et al. 2011, McGowan et al. 2013, Horn et al. 2021) wurde eine Gesamtsensitivität von 60 % und -spezifität von 87 % für basale ACTH-Werte berechnet, solange die Herbstmonate ausgeschlossen blieben. Darüber hinaus gilt die Messung von negativen ACTH-Basalwerten außerhalb vom Herbst bei Pferden mit einer hohen Vortestwahrscheinlichkeit als wenig hilfreich (Menzies-Gow et al. 2023).

DISKUSSION

4.3.3.3 Diskussion der ACTH-Zehnminutenwerte im TRH-Dosisvergleich

Die ACTH-Zehnminutenwerte wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden TRH-Dosierungen auf ($p = 0,28$). Allerdings zeigten sich tendenziell niedrigere Werte bei der geringeren Dosierung (0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TRH: 241 ± 196 pg/ml und 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TRH: 282 ± 256 pg/ml). Lediglich 7 der 18 Individuen wiesen bei der niedrigeren Dosierung höhere ACTH-Zehnminutenwerte auf. Die ACTH-Zehnminutenwerte sind in der Diagnosestellung von großer Relevanz, da sie der Einordnung des Patienten in eine der drei Kategorien (*PPID unlikely / Interpretive Zone* bzw. *equivocal / PPID likely*, Kap. 2.3.3) dienen. Daraus resultiert folglich die Entscheidung der behandelnden PferdetierärztInnen, wie die weitere Therapie und das Monitoring für einen Patienten zu wählen ist.

Da der Zeitpunkt 10 Minuten nach TRH-Injektion häufig genutzt wird, sollte die potentielle Fehleranfälligkeit dieses Parameters beachtet werden. Der Zeitpunkt der Probenentnahme ist möglichst exakt zu treffen, da in diesem Zeitraum die ACTH-Werte noch steil abfallen. Sowohl eine frühere Blutentnahme 9 Minuten nach TRH-Gabe als auch eine zu späte Blutentnahme 11 Minuten danach führte bei 5 von 24 Pferden (21 %) zu einer veränderten PPID-Kategorie (*unlikely, equivocal, likely*). Die ACTH-Werte nach 9 bzw. 11 Minuten wurden mit dem als korrekt anzusehenden Ergebnis exakt 10 Minuten nach TRH-Gabe verglichen. Die eine Minute frühere Blutentnahme (9 Minuten) änderte den Status eines Pferdes mit Werten in der *Interpretive Zone* zu einem *PPID likely* Ergebnis und drei *PPID unlikely* getestete Pferde wurden als *equivocal* eingestuft. Eine spätere Blutentnahme (11 Minuten) kategorisierte ein *PPID likely* Pferd als *equivocal* (Thane et al. 2022). In einer weiteren Studie wurden die ACTH-Werte 9, 10 und 11 Minuten nach TRH-Gabe bei 15 Gesunden und 12 an PPID erkrankten Pferden miteinander verglichen. Bei den Kranken wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Zeitpunkten festgestellt:

9 min: 217 pg/ml [95 % CI: 150-387] vs.

10 min: 210 pg/ml [95 % CI: 143-394] vs.

11 min: 267 pg/ml [95 % CI: 157-341], $p = 0,3$.

DISKUSSION

Allerdings ergab sich bei der Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied, der auf der Differenz zwischen den 9- und 11-Minuten-Werten beruhte:

9 min: 49,4 pg/ml [95 % CI: 36,1-62,6] vs.

10 min: 46,8 pg/ml [95 % CI: 37,8-61,5] vs.

11 min: 44,3 pg/ml [95 % CI: 32,8-60,4], $p = 0,03$.

Insgesamt wäre trotz Einschluss klinischer Symptome bei 11 % (3/27) der Fälle eine Missklassifikation der PPID-Kategorie durch die eine Minute zu frühe oder zu späte Blutentnahme entstanden (Vorster et al. 2023).

In der eigenen Studie wurden 13 der 18 Probanden anhand ihrer ACTH-Zehnminutenwerte bei beiden TRH-Dosierungen der gleichen Kategorie zugeordnet. Drei Probanden zeigten – wie erwartet – nach 0,5 µg/kg TRH eine so viel niedrigere ACTH-Antwort als nach 2 µg/kg, dass sie nach den Empfehlungen der EEG in die nächstniedrigere PPID-Kategorie fielen (Hart et al. 2023). Andererseits wiesen auch zwei Probanden nach der geviertelten Dosis einen Wechsel in die nächsthöhere Kategorie auf. Ursächlich für den Wechsel der Kategorie könnte ein ungenauer Probenentnahmezeitpunkt gewesen sein. Bei den eigenen Probenentnahmen bestand zwar kein Vier-Augen-Prinzip, es wurde aber mit einer digitalen Uhr mit Sekundenzähler gearbeitet. Zudem wurden rechtzeitig zuvor 6 ml Blut zum Verwerfen entnommen und das Multiadaptersystem mit Probenröhrchen auf den Probenentnahmeschlauch aufgesetzt, sodass zum korrekten Zeitpunkt lediglich der Drei-Wege-Hahn für die Probenentnahme aufgedreht werden musste. Es gab keine Zwischenfälle oder Probleme im Handling, sodass alle eigenen Blutproben immer zum genau festgelegten Zeitpunkt entnommen werden konnten.

Eine mögliche Ursache könnte in der individuell vorhandenen biologischen Varianz der ACTH-Reaktion auf TRH liegen. Allerdings wurde bei TRH-Stimulationstests im Winter im Gegensatz zum Herbst eine exzellente Test-Retest-Zuverlässigkeit (Intraklassen-Korrelationskoeffizient: 0,97) festgestellt. Die TRH-Tests wurden im Abstand von zwei Wochen bei sechs PPID-Pferden und acht Kontrollen durchgeführt, wobei die Diagnose anhand klinischer Symptome und des ersten TRH-Tests gestellt wurde. Es trat kein

DISKUSSION

signifikanter Wocheneffekt im Winter auf. Labordiagnostisch wurden dennoch im Winter zwei Pferde missklassifiziert, da sie ursprünglich als an PPID erkrankt (ACTH-Basalwert > 24,0 und ACTH-Dreißigminutenwert post TRH > 53,2 pg/ml) diagnostiziert wurden und im zweiten Test zwei Wochen später die ACTH-Konzentrationen unter den Cut-offs lagen (Kam et al. 2021).

Die ACTH-Ausschüttungen nach TRH scheinen intraindividuellen Schwankungen zu unterliegen, die dazu führen können, dass das gleiche Pferd auch bei zeitnah durchgeführten Tests in unterschiedliche PPID-Kategorien fällt. Dies gilt vor allem für Pferde mit ACTH-Zehnminutenwerten, die nahe an oder im Bereich der *Interpretive Zone* von 100 – 200 pg/ml liegen. Dies scheint in der eigenen Studie nicht durch eine zu kurze Wash-out-Zeit oder die niedrigere TRH-Dosis von 0,5 µg/kg verursacht worden zu sein, da es hier keine statistisch signifikanten Unterschiede gab. Laut der eigenen Ergebnisse besitzen die ACTH-Zehnminutenwerte auch bei einer Dosis von 0,5 µg/kg TRH keine andere Aussagekraft als jene nach 2 µg/kg TRH.

4.3.3.4 Diskussion der ACTH-Dreißigminutenwerte im TRH-Dosisvergleich

Dreißig Minuten nach TRH-Injektion ergaben sich in der eigenen Studie signifikant niedrigere ACTH-Konzentrationen nach 0,5 µg/kg als nach 2 µg/kg TRH. Nach einer halben Stunde lagen die ACTH-Werte bei 16 der 18 Probanden nach 2 µg/kg höher als nach 0,5 µg/kg TRH und bei den verbleibenden zwei Probanden waren sie identisch. Anders als bei den ACTH-Zehnminutenwerten, gab es also keine Individuen, bei denen die niedrigere TRH-Dosis gleichwohl eine höhere ACTH-Ausschüttung auslöste. Die EEG empfiehlt seit 2023 Cut-off-Werte für ACTH 30 Minuten nach TRH-Injektion (Hart et al. 2023). Für den Zeitraum Januar bis Juni gelten folgende Werte:

- | | |
|---|---------------------|
| 1. <i>PPID unlikely</i> („negativ“): | ACTH < 40 pg/ml |
| 2. <i>Interpretive Zone</i> („Graubereich/ <i>equivocal</i> “): | ACTH: 40 - 90 pg/ml |
| 3. <i>PPID likely</i> („positiv“): | ACTH > 90 pg/ml |

DISKUSSION

In der eigenen Studie wurden bei vier Probanden (Proband 2, 4, 7 und 18) in beiden TRH-Tests ACTH-Konzentrationen oberhalb des Cut-off-Wertes von 90 pg/ml gemessen. Proband 17 wies 30 Minuten nach der TRH-Dosis von 2 µg/kg einen ACTH-Wert von 101 pg/ml auf, was ihn ebenfalls als *PPID likely* klassifizierte. Interessanterweise waren unter diesen Probanden alle drei Pferde, die klinisch eine generalisierte Hypertrichose aufwiesen (Proband 4, 7 und 18). Bis auf Proband 4, eine 22-jährige Tinkerstute, die anhand des ACTH-Wertes 10 Minuten nach 0,5 µg/kg TRH in der *Interpretive Zone* gelandet wäre, wurden die anderen vier Probanden auch anhand des ACTH-Zehnminutenwertes als *PPID likely* klassifiziert. Somit stimmt die Klassifizierung bei Pferden mit klinisch ausgeprägten Symptomen anhand der ACTH-Messzeitpunkte 10 und 30 Minuten nach TRH gut überein. Die Verwendung der ACTH-Dreißigminutenwerte zur PPID-Diagnostik wurde im Vergleich zum ACTH-Zehnminutenwert bislang weniger oft beschrieben (Beech et al. 2007, Funk et al. 2011, Horn et al. 2021, Kirkwood et al. 2022b). Für die ACTH-Werte 30 Minuten nach TRH wurden mithilfe von 40 bis 47 Kontrollen und 5 bis 9 an PPID erkrankten Pferden monatliche diagnostische Cut-off-Werte entwickelt. Es wurden eine Gesamtsensitivität von 87 % und -spezifität von 94 % angegeben (Horn et al. 2021). Aufgrund der eigenen statistischen Ergebnisse eignet sich die Nutzung des ACTH-Dreißigminutenwertes nach Gabe von 0,5 µg/kg allerdings nicht zur Beurteilung und Diagnosestellung bei potenziell an PPID erkrankten Pferden.

4.3.3.5 Diskussion der ACTH-Maximalwerte im TRH-Dosisvergleich

Nach der TRH-Injektion stiegen bei allen Probanden die ACTH-Konzentrationen deutlich an und alle Probanden zeigten ihr ACTH-Maximum unabhängig von der jeweils verwendeten Dosierung zum ersten Probenzeitpunkt 5 Minuten nach der intravenösen TRH-Injektion. Beech et al. (2007) sammelten 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 30, 60 und 180 Minuten nach TRH-Gabe Blutproben für insgesamt 61 TRH-Stimulationstests bei 48 sowohl an PPID erkrankten als auch gesunden Pferden. Alle Pferde erreichten ihr ACTH-Maximum innerhalb der ersten 6 Minuten: Bei 9 Tests wurde das Maximum nach 2, bei 37 Tests nach 4 und bei 15 Tests nach 6 Minuten erreicht. Dagegen zeigten neun gesunde Pferde bei in sechs verschiedenen Monaten wiederholten TRH-Tests mit

DISKUSSION

Blutprobenentnahmen zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60 und 180 Minuten variable Zeitpunkte ihrer ACTH-Peaks 5 bis 45 Minuten nach TRH (Funk et al. 2011). Die Autoren vermuten, dass bei gesunden Pferden die ACTH-Antwort auf 1 mg TRH nicht stark genug sei, um einheitliche Peaks auszulösen. In einer Studie, die den Einfluss von zeitlich ungenauen Blutprobenentnahmen auf die ACTH-Konzentrationen beim TRH-Stimulationstest bei 27 Pferden untersuchte, erfolgte die früheste Probenentnahme 9 Minuten nach TRH-Gabe, gefolgt von Probenentnahmen nach 10 und 11 Minuten. Hier erreichten 13 Pferde ihr ACTH-Maximum 9 Minuten nach TRH-Gabe, 9 Pferde nach 10 Minuten, 3 Pferde nach 11 Minuten und ein Pferd nach 29 Minuten (Vorster et al. 2023). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse ebenso wie Studien, die ACTH-Verläufe analysieren und nicht lediglich auf ein bis zwei Messungen basieren, dass es individuell manchmal zu ungewöhnlichen Kurven kommen kann, ohne dass diese durch Phänomene wie offensichtliche Schmerzen oder Stress erklärbar sind.

4.3.4 Diskussion der ACTH-Werte in der Therapiestudie

Die statistischen Berechnungen (t-Tests abhängiger Stichproben) ergaben keine signifikanten Unterschiede der ACTH-Werte nach der jeweils vier- bis sechswöchigen Placebogabe bzw. Pergolidtherapie. Auch der Vergleich der initial erfolgten ACTH-Bestimmungen mit jenen nach Placebo und nach Therapie blieb ohne statistische Signifikanz. Dies bezieht sich auf die AUCs, Basal-, Zehnminuten-, Dreißigminuten- und Maximalwerte.

In einem systematischen Review über die Effektivität von Pergolid, in das die Daten von 28 Publikationen einfließen, wurde eine Reduktion der basalen bzw. TRH-stimulierten ACTH-Werte in 44 – 74 % der Fälle nach Therapie festgestellt. Die PPID-Diagnose wurde in einem Großteil der Studien (21 von 28) mittels Kombination aus klinischem Bild und mindestens einer pathologisch abweichenden labordiagnostischen Untersuchung (basales ACTH, TRH-Stimulationstest oder Dexamethason-Suppressionstest) gestellt. Bei 28 – 74 % der Patienten normalisierten sich die ACTH-Werte durch die Therapie mit

DISKUSSION

Pergolid sogar wieder. Außerdem fand bei über 75 % der Fälle eine Verbesserung der klinischen Symptome statt (Tatum et al. 2020).

Auch in der eigenen Arbeit wurde je nach Parameter (ACTH-AUC, ACTH-Basal-, Zehnminuten- oder Dreißigminutenwert) eine Reduktion bei 77, 62, 69 und 77 % der Probanden festgestellt (Vergleich post Placebo mit post Pergolid):

- 10 von 13 Probanden zeigten eine Reduktion der AUCs,
- 8 von 13 eine Reduktion der ACTH-Basalwerte,
- 9 von 13 eine Reduktion der ACTH-Zehnminutenwerte und
- 10 von 13 eine Reduktion der ACTH-Dreißigminutenwerte.

Allerdings lagen bei Proband 1, 10, 12 und 18 die ACTH-Konzentrationen post Pergolid zum Teil deutlich höher als post Placebo, was die fehlende statistische Signifikanz erklären könnte. Auf diese Probanden wird speziell im nächsten Kapitel eingegangen.

Die EEG empfiehlt bei Pferden, die nur milde klinische Symptome aufweisen und deren ACTH-Wert 10 Minuten nach TRH-Stimulation in den Bereich der *Interpretive Zone* fällt, eine Reevaluierung nach drei bis sechs Monaten (Hart et al. 2023). In die eigene Therapiestudie wurden neben zehn als *PPID likely* klassifizierten Pferden auch drei als *equivocal* eingestufte Probanden (Proband 1, 14 und 16) aufgenommen. Während Proband 1 und 14 keine Auffälligkeiten im Fell aufwiesen, zeigte von den *equivocal* Patienten nur Proband 16, eine 21-jährige Warmblutstute, fokal im Bereich hinter der Schulter ein sehr leicht längeres Haarkleid. In praxi werden sicherlich viele Pferde mit ACTH-Werten in der *Interpretive Zone* behandelt. Da bisher kaum Verlaufsdaten bei solchen Fällen bzw. bei subklinischer oder früher PPID publiziert sind, wurden diese Pferde in die eigene Studie eingeschlossen. Immerhin konnten Kirkwood et al. (2022b) in einer kleinen, prospektiven Fallstudie die Entwicklung von sieben Pferden ohne klinische PPID-Symptome, aber mit mindestens drei von zwölf erhöhten ACTH-Werten (basal oder TRH-stimuliert) über ca. vier Jahre verfolgen. Sechs der sieben Pferde entwickelten im Studienzeitraum eine Hypertrichose, die bei zwei Pferden generalisiert und bei vier Pferden mild bzw. intermittierend auftrat. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es wahrscheinlich ist, dass *equivocal* Pferde mittelfristig eine klinische PPID

DISKUSSION

entwickeln. Weitere (Langzeit-)Studien zur frühen klinischen und labordiagnostischen Erkennung einer PPID, dem natürlichen Verlauf und zur Therapie sind nötig, um den möglichen Nutzen einer frühen Pergolidtherapie besser abschätzen zu können.

4.3.4.1 Diskussion der ACTH-Verläufe in der Therapiestudie

Bei 11 von 13 Probanden ergaben sich bei allen drei TRH-Tests (initial, post Placebo und post Pergolid) klassische Kurvenverläufe. Proband 4 und 8 wiesen bei jeweils einem der drei Tests einen abweichenden Kurvenverlauf mit einem zweiten ACTH-Anstieg auf.

Bei acht Probanden (Proband 2, 3, 4, 7, 8, 13, 14 und 17) zeichnete sich beim TRH-Test nach Pergolidtherapie im Vergleich zum initialen TRH-Test und zu dem TRH-Test nach Placebogabe eine eindeutig flachere ACTH-Verlaufskurve ab. Es ließ sich ein sichtbarer Effekt des Pergolids feststellen. Allerdings lassen sich diese Effekte nur intraindividuell deuten, da die ACTH-Konzentrationen zumeist trotzdem noch im Bereich der Kategorien *equivocal* oder *PPID likely* lagen.

Proband 16 ließ nur einen mäßigen Abfall der ACTH-Kurve nach Pergolid im Vergleich zum Verlauf initial und post Placebo erkennen. In einer Studie, die die Fütterung und Gabe von Pergolid auf die Ergebnisse von TRH-Stimulationstests bei 53 Pferden untersuchte, hatten an PPID erkrankte Pferde, die mit Pergolid behandelt wurden (n = 20) im Vergleich zu unbehandelten, an PPID erkrankten Pferden (n = 20) 10 Minuten nach TRH sogar höhere ACTH-Konzentrationen (Drozdewska et al. 2023). Diese Ergebnisse passen teilweise zu den eigenen, denn bei vier Tieren (Probanden 1, 10, 12, 18) ließ sich nach Pergolid keine Verminderung der ACTH-Ausschüttungen feststellen, sondern - außer bei Proband 1 - sogar höhere Werte als bei den vorigen Tests.

Proband 10, eine 16-jährige Halbblut Stute, wies nach 38-tägiger Therapie mit Pergolid am 03.06.2021 eine geringgradig höhere ACTH-Verlaufskurve auf als post Placebo und initial. Die Stute zeigte klinisch keine Auffälligkeiten des Haarkleids oder Fellwechsels. Sie fiel zu keinem Zeitpunkt mit Hinweisen auf Schmerz oder Stress auf, weshalb diese Gründe als Ursache für eine Erhöhung der ACTH-Konzentrationen auszuschließen sind. Um zu überprüfen, ob die Stute in den folgenden Herbstmonaten deutlichere

DISKUSSION

labordiagnostische Hinweise auf eine PPID entwickelte, wurden weitere Blutentnahmen durchgeführt. Am 19.08.2021 lag die basale ACTH-Konzentration bei 77 pg/ml und somit ganz knapp im *PPID likely* (> 75 pg/ml) Bereich entsprechend der Empfehlungen der EEG für August (Hart et al. 2023). Am 15.09.2021 lag die basale ACTH-Konzentration bei 71 pg/ml und somit in der *Interpretive Zone* (30-90 pg/ml) für September (Hart et al. 2023). Die Kontrollen der ACTH-Basalwerte weisen darauf hin, dass Proband 10 im Laufe des Frühsommers labordiagnostisch eine PPID entwickelte. Dieser Umstand könnte möglicherweise erklären, warum die ACTH-Verlaufskurve post Pergolid im Juni nicht die zu erwartende Abflachung aufwies. Leider konnte die Entwicklung der Stute aber nicht weiterverfolgt werden.

Proband 12, ein 15 Jahre alter Appaloosa-Mix-Wallach, wies etwa 2- bis 3-fach höhere ACTH-Werte nach 39-tägiger Therapie mit Pergolid auf als post Placebo und initial. Der Wallach zeigte vorberichtlich und im gesamten Studienzeitraum keine Auffälligkeiten des Haarkleids oder Fellwechsels. Auch am 16.07.2021, dem Tag des letzten TRH-Stimulationstests nach Pergolid, ergaben sich keine Auffälligkeiten in der klinischen Untersuchung und keine Hinweise auf Stress oder Schmerzen. Während alle anderen TRH-Tests der Therapiestudie zwischen Januar und Juni durchgeführt wurden, lag der Test nach Therapie bereits zu Beginn des Zeitraums, in dem die ACTH-Werte saisonal und bei an PPID Erkrankten überproportional ansteigen. Um zu überprüfen, ob Proband 12 in den folgenden Herbstmonaten deutlichere Hinweise auf eine PPID entwickelte, wurden monatliche Kontrollen durchgeführt. Klinisch blieb der Wallach unauffällig. Am 16.08.2021 lag seine basale ACTH-Konzentration bei 31 pg/ml, am 15.09.2021 bei 28 pg/ml und am 16.10.2021 bei 29 pg/ml. Die Werte wurden aufgrund der jahreszeitlichen Referenzbereiche demnach im August als *equivocal* und im September und Oktober sogar als *PPID unlikely* kategorisiert. Somit konnten die pathologisch erhöhten ACTH-Werte ausschließlich nach Therapie bei diesem Probanden nicht mit einer beginnenden PPID erklärt werden. Sorgfältig wurden die Patientendaten nochmals geprüft. Erwähnenswert scheint, dass das Pferd vorberichtlich an einer Equinen rezidivierenden Uveitis litt, weshalb der linke Bulbus oculi bereits 2020 chirurgisch entfernt worden war. Das rechte Auge wies einen Mikrophthalmus auf, was in der Regel die Folge einer Uveitis

DISKUSSION

aufgrund der progressiven Zerstörung darstellt. Die Erkrankung geht mit rezidivierenden Entzündungen einher, die teilweise für die Pferde sehr schmerzhaft sein können. Anzeichen sind z.B. Blepharospasmus, Epiphora, Photophobie oder Konjunktivitis. Keines dieser Symptome wurde von dem Appaloosa-Mix-Wallach gezeigt. Bei der Tigerschecken-Uveitis geht die Erkrankung allerdings häufig ohne sichtbare, äußere Symptome vonstatten (Baumgart und Gerhards 2014). Um äußerlich nicht sichtbare Schmerzen im Rahmen von Entzündungsschüben am Auge oder auch andere Arten von starken Schmerzen und Stress auszuschließen, wurde nachträglich Cortisol in den gefrorenen Serum-Rückstellproben ermittelt. Die Cortisolwerte lagen an den vier Testtagen bei 2,5 µg/dl, 1,8 µg/dl, 3,3 µg/dl und 2,2 µg/dl und somit allesamt im unteren Referenzbereich (1,0 – 6,7 µg/dl). Insgesamt bleibt damit der höhere ACTH-Kurvenverlauf nach Pergolidtherapie bei diesem Probanden unerklärt; ausgeschlossen wurde sowohl eine beginnende PPID als auch starke Schmerzen oder Stress.

Proband 18 war ein 28-jähriger Araberwallach, der in den TRH-Stimulationstests initial und nach Placebo mit einer als moderat zu bewertenden ACTH-Ausschüttung reagierte (Abb. 45). Der letzte TRH-Stimulationstest, der am 11.06.2022 nach 42-tägiger Therapie mit Pergolid durchgeführt wurde, ergab allerdings extrem hohe ACTH-Ausschüttungen. Auffällig war bereits der basale ACTH-Wert, der mit 64 pg/ml ca. dreimal so hoch war wie die zuvor bei diesem Pferd gemessenen Basalwerte. Auf die TRH-Injektion erfolgte eine massive ACTH-Ausschüttung mit dem Maximalwert der gesamten Studie von 4000 pg/ml nach 5 Minuten und einem Zehnminutenwert von 1590 pg/ml. Auch die Kontrollen zu den nachfolgenden Blutentnahmezeitpunkten ergaben deutlich höhere ACTH-Werte im Vergleich zu jenen, die bisher bei diesem Pferd gemessen wurden. Am 11.06.2022 fiel erstmals eine geringgradige Lahmheit vorne rechts auf. Der Proband litt vorberichtlich an Arthrosen in den Vordergliedmaßen. Pferde mit chronischen Schmerzen (n = 22) wie z.B. bei degenerativen Gelenkerkrankungen wiesen im Vergleich zu gesunden Kontrollpferden (n = 24) signifikant höhere basale ACTH-Konzentrationen ($40,9 \pm 9,5$ und $23,2 \pm 2,7$ pg/ml, $p < 0,01$) auf (Ayala et al. 2012). Klinisch wurden die Lahmheit und der Schmerzgrad bei Proband 18 als geringgradig eingestuft, weshalb zwar ein geringer Einfluss auf die ACTH-Werte denkbar ist, sich der

DISKUSSION

massive ACTH-Anstieg nach TRH aber nicht erklären lässt. Der Wallach zeigte Schweifschlagen und Beißen ins Fell, was durch Fluginsekten erklärbar war. Stress stellt einen bekannten Faktor dar, der zu einer vermehrten ACTH-Ausschüttung aus der Pars distalis führen kann. Stressoren wie Training, Transport, das Anlegen einer Nasenbremse sowie neue, audio-visuell erzeugte Reize führen zu signifikant höheren ACTH-Konzentrationen bei Pferden (Hada et al. 2003, Fazio et al. 2008, Cravana et al. 2010, Thompson et al. 2019). Möglicherweise hat der Stress durch die Fliegen bei dem Probanden zu dem erhöhten basalen ACTH-Werten beigetragen.

Die Besitzerin berichtete, dass der Wallach vor der letzten Untersuchung post Pegolid vermehrt im Unterstand gestanden habe, teilweise an der Brust geschwitzt habe sowie insgesamt träger gewesen sei. Der Wallach wies trotz sommerlicher Außentemperaturen auch nach Therapie eine generalisierte Hypertrichose auf. Eine veränderte Thermoregulation in Form einer Hyperhidrose oder auch Anhidrose wird bei Pferden mit PPID als weniger häufig vorkommendes Symptom beschrieben. Auch wenn bisher keine genauen pathophysiologischen Mechanismen bekannt sind, wird davon ausgegangen, dass die Hyperhidrose die Folge einer Hypertrichose bei warmem Klima ist (Kirkwood et al. 2022a). Apathisches Verhalten und vermehrtes Schwitzen sind aber auch als unerwünschte Arzneimittelwirkungen des Pergolids im Beipackzettel (Pergoquin®, WDT, Garbsen) beschrieben. Proband 18 stand 42 Tage unter Therapie mit dem Wirkstoff. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen treten in der Regel zu Beginn der Therapie oder nach Dosiserhöhung auf. Der Araber zeigte das von der Besitzerin beschriebene Verhalten allerdings erst gegen Ende der sechswöchigen Therapie. Daher erscheint es eher unwahrscheinlich, dass die Symptome eine Folge der Medikamentengabe darstellten.

Der Schimmelwallach wies äußerlich sichtbare Melanome bei mäßigem bis schlechtem Ernährungs- und Bemuskelungszustand auf. Insbesondere die Umfangsvermehrungen am Anus und an der Schweifrübe waren raumfordernd. Wenngleich sich die Melanome innerhalb des Studienzeitraums nicht eindeutig vergrößerten, beschrieb die Besitzerin, dass der Wallach in den letzten Wochen manchmal mit Stöhnen und Pressen beim Kotabsatz aufgefallen sei. Nach Abschluss der Studie wurde der Wallach weiter mit

DISKUSSION

Pergolid in erhöhter Dosis (1,5 mg) behandelt. Etwa zwei Wochen später verschlechterte sich der Zustand des Wallachs deutlich, weshalb der Araber am 04.07.2022 durch den Haustierarzt euthanasiert wurde. Eine Sektion durfte leider nicht durchgeführt werden. Letztlich erscheint der Autorin am wahrscheinlichsten, dass Proband 18 neben seiner PPID an einer weiteren Grunderkrankung litt, am wahrscheinlichsten der Metastasierung seiner Melanome, deren Ausprägung gegen Ende der Studie rapide zunahm und die indirekt zu den stark erhöhten ACTH-Konzentrationen am letzten Testtag führten.

Zusammenfassend zeigen die eigenen Ergebnisse, dass durch vier- bis sechswöchige Pergolidgaben an Probanden mit initial basalen ACTH-Werten ≤ 40 pg/ml, also im *PPID unlikely* bzw. *equivocal* Bereich, die ACTH-Ausschüttung durch TRH statistisch nicht nachweisbar erniedrigt wird. In der Studie der eigenen Arbeitsgruppe an PPID-Patienten mit deutlichen Symptomen wurden bereits die TRH-stimulierten ACTH-Konzentrationen vor und nach sechs- bis achtwöchiger Therapie verglichen. Bei zehn von elf Probanden (91 %) blieben die ACTH-Zehn- und Dreißigminutenwerte oberhalb des Referenzbereiches (Schorn 2019). Somit kann derzeit nicht empfohlen werden, anhand von TRH-Tests eine Therapiekontrolle bzw. eine Dosisanpassung des Pergolids durchzuführen.

4.3.4.2 Diskussion der ACTH-Basalwerte in der Therapiestudie

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der ACTH-Basalwerte zwischen den Testzeitpunkten (initial: $19,5 \pm 5,8$; post Placebo: $21,5 \pm 9,95$; post Pergolid: $23,8 \pm 13,2$ pg/ml). Die fehlende Signifikanz widersprach der Erwartung, dass die Basalwerte nach Pergolidtherapie niedriger sein sollten, wie es bereits in der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte: Nach der Therapie von elf an PPID erkrankten Pferden mit initial erhöhten basalen ACTH-Werten wurde eine signifikante ($p = 0,001$) Reduktion erreicht (Schorn 2019). Durham (2016) untersuchte 2014 (ohne die Daten im Detail anzugeben), wie sich die basalen ACTH-Werte bei 402 an PPID erkrankten Pferden nach ein bis zwei Monaten Pergolid ($2 \mu\text{g}/\text{kg}$ KGW oral alle 24 Stunden) änderten und ob sie wieder in den

DISKUSSION

Referenzbereich (< 29 pg/ml) fielen. Die Auswertungen ergaben, dass 30 % der Probanden wieder ACTH-Werte in der Referenz aufwiesen. Bei 59 % wurde eine Reduktion des ACTH-Wertes erzielt, der aber nicht bis in den Referenzbereich sank. Allerdings gab es auch 11 % Non-Responder, bei denen keine deutliche Veränderung der basalen ACTH-Werte festgestellt werden konnte. Auch in einer Studie, die den Effekt von Pergolid bei 64 PPID-verdächtigen Pferden untersuchte, wurde nach 27 – 99 Tagen ($50,0 \pm 16,7$ Tage) Therapie eine signifikante Reduktion ($p = 0,006$) der basalen ACTH-Werte erreicht (Durham 2022). Im Gegensatz zu den genannten Studien lagen bei den eigenen Probanden zu Beginn der Studie keine hohen basalen ACTH-Ausgangswerte vor. Daher war es nicht verwunderlich, dass das Pergolid nicht zu deutlich niedrigeren Werten führte.

Der Studienstart lag je nach Proband zwischen Dezember und April, da vermieden werden sollte, dass der letzte Test in die sogenannten Herbstmonate mit den saisonal höheren Werten fiel. Dennoch ist zu bedenken, dass die Studiendauer zwischen 79 und 95 Tagen betrug, sodass mit intraindividuellen Unterschieden gerechnet werden muss.

Hinsichtlich der Einteilung in eine der nach Hart et al. (2023) definierten Kategorien anhand der ACTH-Basalwerte, lagen sieben Probanden vor allen drei Tests in der *Interpretive Zone*. Bei vier Probanden lagen die basalen ACTH-Konzentrationen je nach Testtag entweder im *PPID unlikely* oder *equivocal* Bereich. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Großteil der Probanden keine hohen Ausgangswerte und bei wiederholten Messungen des basalen ACTHs nur kleine Schwankungen aufwies, auch wenn mehrere Wochen dazwischen lagen. Auffällig war Proband 17, dessen Basalwert jedes Mal in eine andere Kategorie fiel: initial (14 pg/ml) *PPID unlikely*, post Placebo (53 pg/ml) *PPID likely* und post Pergolid (37 pg/ml) *equivocal*. Zudem fiel Proband 18 auf, der beim initialen und beim Test nach Placebo einen identischen ACTH-Wert von 21 pg/ml (*equivocal*) aufwies und nach Pergolid einen erheblich höheren Wert von 64 pg/ml (*PPID likely*) zeigte. Beide Probanden wiesen eine Hypertrichose auf, die bei Proband 17 regional ausgeprägt war und bei Proband 18 generalisiert.

Bei Proband 17 wurde der höchste basale ACTH-Wert von 53 pg/ml (*PPID likely*) nach der Placebogabe am 27.03.2022 gemessen. Dieser Wert lässt sich folglich nicht mit der

DISKUSSION

Saison erklären. Allerdings war aufgefallen, dass dem Testtag eine ungewöhnlich warme Wetterperiode von ca. zwei Wochen vorausgegangen war. Es wäre denkbar, dass dieses sommerliche Wetter dem Tier den Eindruck einer späteren Jahreszeit vermittelt hat, was zu einem Anstieg der ACTH-Werte führte. Untersuchungen zum Einfluss der Außentemperaturen bzw. der Sonnenscheindauer auf die ACTH-Werte beim Pferd sind der Autorin allerdings nicht bekannt. Üblicherweise wird der spätsommerlich-herbstliche Anstieg der ACTH-Konzentrationen mit der verkürzten Tageslichtlänge ab dem 21.06. auf der Nordhalbkugel erklärt (Beech et al. 2009).

Der TRH-Test post Therapie wurde bei Proband 18 am 11.06.2022 durchgeführt. Durham et al. (2021) zeigten anhand der ACTH-Bestimmungen bei 75.892 Equiden, dass bereits nach der 22. Kalenderwoche (Anfang Juni) der saisonal bedingte Anstieg der ACTH-Konzentrationen beginnt, bis ein Peak in der 39. und 40. Kalenderwoche (Ende September, Anfang Oktober) erreicht wird. Bei an PPID Erkrankten steigt das aus der Pars intermedia der Hypophyse stammende ACTH in diesen Wochen überproportional an (Beech et al. 2009, Copas und Durham 2012, Fey 2017). Somit könnte die basale ACTH-Konzentration bei dem klinisch eindeutig an PPID erkrankten Probanden 18 damit erklärt werden, dass die Pergolidgaben den jahreszeitlich zu erwartenden Anstieg nicht vollständig dämpfen konnten. Andererseits zeigte dieser Proband weitere Probleme (Kap. 4.3.4.1), mit denen seine außerordentlich hohen ACTH-Werte am letzten Testtag auch erklärbar sein könnten.

4.3.4.3 Diskussion der ACTH-Zehnminutenwerte in der Therapiestudie

Auch die ACTH-Zehnminutenwerte wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen post Placebo (215; 148/436 pg/ml) und post Pergolid (142; 114/389 pg/ml) auf, auch wenn Median und Quartile unter Therapie sanken. Immerhin zeigten 9 der 13 Probanden nach Therapie zum Teil deutlich niedrigere Zehnminutenwerte als nach Placebo, wobei 5 sogar in die nächstniedrigere Kategorie, also von *PPID likely* zu *equivocal* ($n = 3$) oder von *equivocal* zu *PPID unlikely* ($n = 2$) eingeordnet werden konnten. Die meisten Probanden ($n = 7$) blieben allerdings in der gleichen Kategorie,

DISKUSSION

wobei Proband 14 bereits nach Placebo als *PPID unlikely* eingestuft wurde und sich somit in der Kategorie nicht weiter verbessern konnte. Proband 12 verschlechterte sich nach dem Pergolid von *equivocal* zu *PPID likely*.

Durham (2022) verglich bei 64 Pferden die ACTH-Zehnminutenwerte nach TRH-Stimulationstests vor und 27 – 99 Tage ($50,0 \pm 16,7$ Tage) nach täglicher Gabe des Pergolids. Hier zeigte sich nach dem Pergolid eine signifikante Reduktion ($p < 0,0001$) im Vergleich zum ersten Test. Allerdings erreichten von den 38 Pferden mit initial positiven ACTH-Konzentrationen nur 24 % ($n = 9$) normale ACTH-Zehnminutenwerte unter Therapie. Bei 34 % ($n = 13$) fielen die Konzentrationen in die *Interpretive Zone* und bei 16 der 38 Pferde (42 %) blieben die ACTH-Zehnminutenwerte im positiven Bereich. Betrachtet man in der eigenen Studie nur die initial als *PPID likely* klassifizierten Pferde ($n = 10$), wiesen 20 % ($n = 2$) post Pergolid TRH-stimulierte ACTH-Zehnminutenwerte im Normalbereich auf, 30 % ($n = 3$) zeigten einen Abfall in die *Interpretive Zone* und bei 50 % ($n = 5$) blieben die Konzentrationen im positiven Bereich. Auch wenn die Probandenanzahl der eigenen Studie geringer war, ähneln diese Prozentzahlen den Ergebnissen von Durham (2022) sehr.

Beim Vergleich der initialen ACTH-Zehnminutenwerte mit jenen nach Placebo zeigten sich letztere als schwach signifikant ($p = 0,04$) niedriger. Wie aus Abb. 28 hervorgeht, fiel der Median nach Therapie weiter ab, aber die Streuung der Werte nahm deutlich zu. Ein Einfluss der biotinhaltigen Tabletten als Ursache für die post Placebo signifikant niedrigeren ACTH-Werte ist als extrem unwahrscheinlich anzusehen. Dagegen ist vorstellbar, dass durch die Studienteilnahme und tägliche Tablettengabe möglicherweise mehr Zeit investiert wurde, um das Pferd zu pflegen und das Mangement zu verbessern. Bei an PPID erkrankten Pferden empfiehlt die EEG zusätzlich zur Therapie mit Pergolid ein besonderes Augenmerk auf die Körperkondition und gutes Fütterungs- und Tränkemanagement zu legen sowie regelmäßig Kontrollen der Hufe, Zähne und des Entwurmungsstatus durchführen zu lassen (Hart et al. 2023). Ziel dieser Maßnahmen ist das Erreichen bzw. der Erhalt eines guten Gesamtzustandes des Pferdes und das Vorbeugen möglicher sekundärer Erkrankungen. Insgesamt ist es unwahrscheinlich, dass diese Maßnahmen die ACTH-Zehnminutenwerte verringern

DISKUSSION

können. Letztlich konnte keine plausible Erklärung für die im Vergleich zu den initial gemessenen ACTH-Zehminutenwerten niedrigeren Konzentrationen nach Placebo gefunden werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die vier- bis sechswöchige Pergolidgabe im Vergleich zum Placebo keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die ACTH-Zehminutenwerte nach TRH hatte. Somit können aus den ACTH-Zehminutenwerten auch keine Empfehlungen zur Therapiekontrolle und Dosisanpassung abgeleitet werden.

4.3.4.4 Diskussion der ACTH-Dreißigminutenwerte in der Therapiestudie

Die ACTH-Dreißigminutenwerte wiesen keine signifikante Reduktion zwischen den Testzeitpunkten auf, auch wenn sich beim Vergleich von initial (69; 49/108 pg/ml) oder post Placebo (60; 48/135 pg/ml) mit post Therapie (45; 36/62 pg/ml) tendenziell niedrigere ACTH-Konzentrationen unter dem Pergolid zeigten. Dies spiegelte sich auch in der Kategorisierung nach Hart et al. (2023) wieder, denn sechs Probanden befanden sich nach Pergolidtherapie im Vergleich zu den post Placebo gemessenen Werten in einer niedrigeren Kategorie: von *PPID likely* zu *equivocal* (n = 2), von *equivocal* zu *PPID unlikely* (n = 3) und von *PPID likely* zu *PPID unlikely* (n = 1). Allerdings wechselten auch zwei Probanden von *PPID unlikely* zu *equivocal*. Die restlichen fünf Probanden blieben in der gleichen Kategorie.

Ähnliche Ergebnisse erhielten McFarlane et al. (2017), die sechs an PPID erkrankte Pferde für sechs Monate unter Therapie mit Pergolid stellten. Die ACTH-Dreißigminutenwerte nach Stimulationstest mit 1 mg TRH zeigten zwar einen Abfall, während die Tiere unter Therapie standen, allerdings konnten ebenfalls keine statistisch signifikanten Veränderungen im Vergleich mit den initialen Werten erzielt werden. Ebenso konnten Rendle et al. (2019), die sechs an PPID erkrankte Pferde mit 4 µg/kg Pergolid therapierten, bei dem Vergleich der TRH-stimulierten ACTH-Dreißigminutenwerte vor und 8 bzw. 18 Tage nach Therapiestart zwar reduzierte ACTH-Spiegel, aber keinen statistisch signifikanten Unterschied feststellen.

DISKUSSION

Aus all diesen Ergebnisse lässt sich - ähnlich wie bei den ACTH-Zehnminutenwerten - schlussfolgern, dass sich auch die ACTH-Dreißigminutenwerte zur Therapiekontrolle nicht eignen.

4.3.4.5 Diskussion der ACTH-Maximalwerte in der Therapiestudie

Der Vergleich der ACTH-Maximalkonzentrationen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei TRH-Tests der Therapiestudie.

Elf Probanden zeigten ihr ACTH-Maximum sowohl nach Placebo als auch nach Pergolid zum ersten Probenzeitpunkt 5 Minuten nach der intravenösen TRH-Injektion. Proband 1 erreichte die maximale ACTH-Konzentration post Therapie erst nach 10 Minuten und Proband 8 erreichte die maximale ACTH-Konzentration post Placebo erst nach 15 Minuten.

Auffällig war, dass die ACTH-Kurven der Probanden 4 (Abb. 42) und 8 (Abb. 37) bei jeweils einem TRH-Test nicht kontinuierlich abfielen. Der erste Peak war bei beiden zum Zeitpunkt 5 Minuten und der zweite 15 Minuten nach TRH-Gabe. Bei Proband 4 fand dieser ungewöhnliche Kurvenverlauf beim initialen Test statt, wobei das ACTH 10 Minuten nach TRH 384 pg/ml und 15 Minuten danach 394 pg/ml betrug, die Werte also fast gleich waren. Dagegen zeigte Proband 8 seine zweigipflige Kurve im TRH-Test nach Placebo (Abb. 37).

In der eigenen Arbeitsgruppe wurden bereits zuvor individuelle Abweichungen vom erwarteten Kurvenverlauf beobachtet. So zeigten sogar sechs von elf an PPID erkrankte Probanden einen ACTH-Kurvenverlauf mit zweitem Konzentrationsanstieg nach dem initialen Peak 5 Minuten nach TRH. Der zweite Konzentrationsanstieg war immer 15 oder 30 Minuten post TRH zu verzeichnen und trat je nach Pferd an unterschiedlichen Testtagen (TRH-Test mit 1,0 µg/kg, TRH-Test mit 2,0 µg/kg oder TRH-Test nach Therapie mit Pergolid) auf. Bei einem Probanden war ein deutlicher zweiter Anstieg der ACTH-Konzentration festzustellen. Bei den anderen fünf Pferden waren die Konzentrationsanstiege sehr gering im Vergleich zum zeitlich vorhergegangenen Wert (Schorn 2019). Der ungewöhnliche Kurvenverlauf nach Placebo bei Proband 8 der

DISKUSSION

eigenen Studie legte es nahe zu prüfen, ob die Proben der Zeitpunkte 5, 10 und 15 Minuten nach der TRH-Injektion vertauscht wurden. Für eine zu erwartende Kurve hätte allerdings sogar eine Ringverwechslung stattfinden müssen, was einen „doppelten“ Fehler beim Bearbeiten bedeuten würde. Da die Röhrchen vorab beschriftet und in korrekter Reihenfolge in einem Gestell platziert wurden, erscheint dies der Autorin allerdings sehr unwahrscheinlich. Die Messungen der Rückstellproben 5, 10 und 15 Minuten nach TRH-Injektion ergaben den gleichen Kurvenverlauf. Mit individuell variierenden Reaktionen auf die Gabe von TRH ist somit vereinzelt zu rechnen.

Die Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass sich nach dem initialen Maximum vor allem in den ersten 30 Minuten nach TRH die ACTH-Werte nicht immer kontinuierlich verringern, sondern erneute leichte Konzentrationsanstiege nicht selten vorkommen. Leider sind in der Literatur fast ausschließlich basale und Zehnminutenwerte des ACTHs dokumentiert. Da individuell verlangsamte ACTH-Abfälle dazu führen können, dass Pferde unnötigerweise unter Therapie gestellt werden, sollten hierzu mehr Daten gesammelt werden.

4.3.5 Diskussion der basalen Insulinwerte

Ein häufiges Begleitsymptom der PPID stellt die Insulindysregulation dar, weshalb ein gleichzeitiges Überprüfen des Insulinstatus empfohlen wird (Hart et al. 2023). So wurde in einer Gruppe von Pferden mit PPID (n = 69) bei gut 30 % eine basale Hyperinsulinämie (> 20 µU/ml) festgestellt (McGowan et al. 2013). Obwohl eine Insulindysregulation meistens bei Pferden mit generalisierter oder regionaler Adipositas vorliegt, kann sie auch bei mageren Pferden vorkommen (Frank et al. 2022). Es gilt, die Hyperinsulinämie-assoziierte Hufrehe (engl.: hyperinsulinemia-associated laminitis, HAL) bei an PPID erkrankten Pferden zu vermeiden. Die Hufrehe stellt eine extrem schmerzhaftes Erkrankung dar, bei der es zu einer diffusen, aspetischen Entzündung der Huflederhaut kommt. Pferde, die an einer PPID erkrankt sind und zusätzlich eine Hyperinsulinämie aufweisen, scheinen ein höheres Risiko zu haben, eine Hufrehe zu entwickeln als solche,

DISKUSSION

die ausschließlich an einer PPID erkrankt sind. Allerdings liegen bisher keine Daten vor, die den Zusammenhang erklären (Menzies-Gow et al. 2023).

In der eigenen Studie sollte durch die Messungen der Insulinwerte ausgeschlossen werden, dass stark Insulin-dysregulierte Probanden an der Studie teilnahmen. Solche Patienten hätten eine sofortige Therapie erhalten und sollten keiner Placebo-Phase ausgesetzt werden.

In der eigenen Studie wurden die basalen Insulinkonzentrationen morgens nach mindestens 12 Stunden Kraftfutterentzug und 2 Stunden Heuentzug durchgeführt. Alle Insulinkonzentrationen lagen innerhalb des laboreigenen Referenzbereiches von 1,0 bis 13,2 $\mu\text{U/ml}$ und waren somit diagnostisch nicht relevant. Während die Insulinwerte bei den meisten Pferden eher im unteren Referenzbereich lagen, fiel Proband 9 mit Werten im zweistelligen Bereich (10,2 und 10,8 $\mu\text{U/ml}$) auf. Die 22-jährige Haflingerstute zeigte eine beginnende Adipositas (BCS 7/9 und CNS 3/5) und hatte aufgrund ihrer Rasse ein erhöhtes Risiko an einem Equinen Metabolischen Syndrom zu leiden. Sie zeigte eine geringgradige Trachtenfußung, allerdings war der Besitzerin keine zuvor aufgetretene Hufrehe bekannt.

Die Messung der basalen Insulinkonzentration stellt ein Diagnostikum mit hoher Spezifität aber niedriger Sensitivität dar, was dazu führt, dass vor allem stärker erkrankte Tiere erkannt werden. Die EEG empfiehlt daher dynamische Tests, wie den Oralen Zuckertest (OST) oder Insulintoleranztest (ITT), zur Diagnostik einer Insulindysregulation anzuwenden (Frank et al. 2022). Sicher wäre bei Proband 9 ein solcher dynamischer Test sinnvoll gewesen, um den Insulinstatus genauer zu bestimmen. Da der Schwerpunkt der eigenen Studie auf der Untersuchung des TRH-Stimulationstests lag, wurde aber auf aufwändige diagnostische Tests hinsichtlich einer Insulindysregulation verzichtet.

Ob die Ergebnisse des TRH-Stimulationstests durch hohe Insulinkonzentrationen beeinflusst werden, ist bislang unklar. Beim Vergleich des Einflusses des TRH-Stimulationstests auf die ACTH-Konzentrationen bei jeweils sechs Stuten mit und ohne Insulinresistenz konnte kein Effekt des Insulinstatus auf die ACTH-Werte festgestellt werden (Valencia et al. 2013). Hingegen führte die parallele Durchführung eines TRH-Stimulationstests und eines oralen Zuckertests in einer Studie mit 30 adulten Pferden zu

DISKUSSION

signifikant niedrigeren ACTH-Konzentrationen 10 Minuten nach TRH-Gabe im Vergleich zu den ACTH-Zehnminutenwerten nach alleinigem TRH-Test (Restifo et al. 2016). Dagegen ergab die Kombination von TRH-Stimulationstests und 2-step-Insulin-Sensitivity-Tests in der Studie von Horn und Bertin (2019) bei 27 Pferden keinen signifikanten Unterschied der ACTH-Konzentrationen im Vergleich zur alleinigen Durchführung des TRH-Stimulationstests. Somit sind weitere Studien nötig, um die mögliche Beeinflussung der ACTH-Werte nach TRH-Stimulation durch Insulin besser einschätzen zu können. Da alle eigenen Probanden zumindest basale Insulinwerte im laboreigenen Referenzbereich aufwiesen und die TRH-Stimulationstests nüchtern durchgeführt wurden, ist nicht davon auszugehen, dass die interindividuell unterschiedlich hohen Insulinwerte Einfluss auf die Ergebnisse der Stimulationstests genommen haben.

4.3.6 Diskussion unerwünschter Arzneimittelwirkungen (UAW)

4.3.6.1 Diskussion der UAW vom TRH

Beim Pferd sind mehrere, regelmäßig auftretende unerwünschte Arzneimittelwirkungen nach der Injektion von TRH bekannt. Hierzu zählen Gähnen, Husten, Kauen, Lippenlecken, Flehmen, Niesen oder Nüsterreiben, Scharren, Kopfschlagen, Halsstrecken und Muskelfaszikulationen (Beech et al. 2007, Goodale et al. 2015, Restifo et al. 2016, Kirkwood et al. 2022a, Thane et al. 2022, Stewart et al. 2023). Bei allen 18 Probanden wurde das Symptom „Kauen“ registriert. Darüber hinaus zeigten viele Pferde Lippenlecken und Gähnen. Seltener beobachtet wurden Flehmen und Husten, Muskelfaszikulationen an der Nüster bzw. Oberlippe, Scharren oder pumpende Atmung. Die eigenen Ergebnisse ähneln denen von Thane et al. (2022), bei deren Untersuchungen 22/24 Pferde Kauen, Lippenlecken oder Lippenschmatzen als Reaktion auf TRH zeigten, 4/24 Husten, 2/24 Scharren, 2/25 Flehmen und ein Pferd Muskelfaszikulationen. Auch in der Studie von Restifo et al. (2016) wurde „Kauen“ am häufigsten registriert: nach 39 von 90 (43%) TRH-Stimulationstests. Während in der eigenen Studie nur wenige Pferde husteten, zeigten in den Untersuchungen von Diez de

DISKUSSION

Castro et al. (2014) hingegen „most horses“ (von sechs Pferden) dieses Symptom. Eine Studie beschreibt das Auftreten von Muskelzittern bei 6 von 48 Pferden nach TRH-Injektion. Es entwickelte sich bei drei dieser Pferde von einer leichten Form zu einem mäßigen, generalisierten Muskelzittern (Beech et al. 2007). Hingegen wurden in der eigenen Studie deutlich mildere Muskelfaszikulationen festgestellt. Dies äußerte sich bei einzelnen Tests der Probanden 4, 5 und 8 als leichtes Zittern bzw. Zucken der Nüstern bzw. Oberlippe. Ein generalisiertes Zittern wurde nie beobachtet.

Die unerwünschten TRH-Wirkungen werden vor allem in den ersten Minuten nach der TRH-Injektion beobachtet. Je nach Studie wird die maximale Zeit des Auftretens von unerwünschten TRH-Wirkungen beim Pferd mit 2 Minuten (Thane et al. 2022), 5 Minuten (Diez de Castro et al. 2014, Restifo et al. 2016), 7 Minuten (Schorn 2019), 9 Minuten (Stallenberger 2020) bzw. 10 Minuten (Goodale et al. 2015) angegeben. In der eigenen Studie wurden im gesamten Beobachtungszeitraum von 15 Minuten Symptome beobachtet, wobei die Frequenz nach 9 Minuten deutlich abnahm.

In der Studie von Restifo et al. (2016) wurden bei 30 Pferden jeweils drei TRH-Stimulationstests (Tag 1, 14 und 35) durchgeführt, um den Effekt des Oralen Zuckertests und von Fütterung auf die ACTH-Werte zu untersuchen. Hierbei wurden die Pferde in den ersten 10 Minuten nach TRH-Injektion hinsichtlich unerwünschter Arzneimittelwirkungen überwacht. Es wurden zwar bei fast allen Probanden (29/30) unerwünschte TRH-Wirkungen beobachtet, allerdings zeigte sich im intraindividuellen Vergleich, dass nur 13 der 30 Pferden diese auch zu jedem der drei Testzeitpunkte aufwiesen. Zehn Pferde zeigten die Symptome auf das TRH nur an einem der drei Testtage und sechs Pferde zeigten sie an zwei der drei Testtage. Anders war es in den eigenen Untersuchungen, in denen bei allen durchgeführten TRH-Stimulationstests jedes Probanden unerwünschte Wirkungen beobachtet wurden. In der eigenen Studie standen die Probanden nach der TRH-Injektion in den ersten 15 Minuten unter ständiger Beobachtung und die Symptome wurden prospektiv und systematisch erfasst. Es ist denkbar, dass in einigen der bisher veröffentlichten Studien nicht alle Symptome bemerkt wurden, da ein genaues Beobachten notwendig ist, um die teils subtilen, teils lautlosen Symptome zu bemerken. Da der Schwerpunkt der Studien auf anderen

DISKUSSION

Themen lag, könnte es sein, dass die Tiere nicht oder nicht lang genug nach den TRH-Injektionen unter Beobachtung standen. Ein weiterer Grund, weshalb in der eigenen Studie unerwünschte Wirkungen häufiger und länger beobachtet wurden, könnte eine gewisse subjektive und sehr aufmerksame Beurteilung durch die Autorin gewesen sein. Sicherlich besteht eine Schwierigkeit darin, die teils subtilen unerwünschten Arzneimittelwirkungen wie z.B. das Kauen und Lippenlecken von dem ganz normalen Verhalten eines (entspannten) Pferdes zu unterscheiden. Auffälligere Symptome wie z.B. Gähnen, Flehmen und Husten wichen daher eindeutiger vom Normalverhalten ab. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die beschriebenen unerwünschten Arzneimittelwirkungen nach intravenöser TRH-Injektion als mild und rasch transient anzusehen sind.

Beim Menschen werden gemäß der Packungsbeilage der TRH Ferring 0,2 mg/ml Injektionslösung (Ferring Arzneimittel GmbH, Kiel) nach intravenöser Verabreichung kurzfristige (über 1-3 Minuten) Symptome wie Hitzegefühl, Übelkeit, Harndrang, milde Kopfschmerzen, Benommenheit, Flush sowie Missempfindungen im Bereich der Abdominal- und Beckenorgane beschrieben. Außerdem können u.a. Geschmacksmissempfindungen, Mundtrockenheit und Hungergefühl vorkommen. Die meisten dieser Symptome würden sich nicht oder nur mit erheblichem Aufwand beim Pferd nachweisen lassen. Allerdings ist es denkbar, dass insbesondere die Symptome wie Kauen, Lippenlecken und Flehmen durch die in der Humanmedizin beschriebenen gastrointestinalen Empfindungen beim Pferd ausgelöst werden könnten.

Das semiquantitative Erfassen der unerwünschten Arzneimittelwirkungen in der eigenen Studie wurde insbesondere im Hinblick auf den TRH-Dosisvergleich als auch auf die Untersuchung des Pergolideffekts durchgeführt. Bisher konnte die eigene Arbeitsgruppe beim Vergleich von 1 µg/kg mit 2 µg/kg TRH keinen Unterschied in der Ausprägung der unerwünschten TRH-Wirkungen feststellen (Schorn 2019, Stallenberger 2020). In der eigenen Studie konnten nur beim Symptom „Gähnen“ schwach signifikant niedrigere Scores bei 0,5 µg/kg im Vergleich zu 2 µg/kg berechnet werden. Hinsichtlich der Scores für alle anderen Symptome und beim Gesamtscore unterschieden sich die Dosierungen nicht. Eine weitere Reduktion der TRH-Dosis erscheint aufgrund der

DISKUSSION

signifikant niedrigeren ACTH-Dreißigminutenwerte nach 0,5 µg/kg TRH nicht sinnvoll. Da die genannten Symptome in den hier erwähnten Studien wie auch in den eigenen Untersuchungen nur vorübergehend bzw. kurzzeitig auftraten und selbstlimitierend waren, sind diese bei indizierten TRH-Tests als tolerabel anzusehen.

Auch die mehrwöchige Behandlung mit Pergolid führte im nachfolgenden TRH-Stimulationstest nicht zu statistisch signifikant weniger unerwünschten Wirkungen. Dies weist darauf hin, dass die Therapie keinen Einfluss auf die individuellen körperlichen Reaktionen auf die TRH-Gabe zu haben scheint.

4.3.6.2 Diskussion der UAW von Pergolid

Laut Herstellerangaben des verabreichten Pergolidpräparates Pergoquin® 1 mg Tabletten (WDT, Garbsen) werden als unerwünschte Arzneimittelwirkungen in seltenen Fällen (mehr als 1 aber weniger als 10 von 10.000 behandelten Tieren) Inappetenz, vorübergehende Anorexie, Lethargie, leichte Anzeichen einer zentralnervösen Störung (z.B. leichte Niedergeschlagenheit oder leichte Ataxie), Diarrhoe und Koliken und in sehr seltenen Fällen (weniger als 1 von 10.000 behandelten Tieren, einschließlich Einzelfallberichte) Schwitzen beobachtet. In der eigenen Studie wurden bei drei Pferden (Proband 2, 3 und 18) potentielle Nebenwirkungen des Pergolids beobachtet: Kotwasser, Kolik, Apathie und Schwitzen. In der Feldstudie der NADA 141-331 (2011), die die Wirkung von Prascend® 1 mg Tabletten (Boehringer Ingelheim Vetmedica, Ingelheim) in einer Dosierung von 2 bzw. 4 µg/kg untersuchte, wurden die unerwünschten Arzneimittelwirkungen bei 122 Pferden über sechs Monate dokumentiert. Als häufigste Symptome wurden bei knapp einem Drittel der Pferde (40/122, 32,8 %) Inappetenz oder ein verminderter Appetit bei mindestens einer Fütterung beobachtet. Das Symptom war bei einem Großteil der Fälle vorübergehend und innerhalb des ersten Monats nach Therapiestart aufgetreten. In der eigenen Studie war keines der 13 Pferde der Therapiestudie mit einem verminderten Appetit aufgefallen. Das zweithäufigste Symptom, das die NADA 141-331 (2011) nennt, war Lahmheit (22/122, 18 %), wobei hierzu keine genaueren Angaben gemacht wurden.

DISKUSSION

Weniger häufig (< 10 %) wurden die folgenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen beobachtet: Diarrhö bzw. weiche Kotkonsistenz, Koliken, Lethargie, abnormer Gewichtsverlust, Hufrehe, Herzgeräusche, Zahnprobleme, Hautabszesse, muskuloskeletale Schmerzen und Verhaltensänderungen (Andrews et al. 2011). Diese Symptome scheinen weit über die in der Packungsbeilage von Pergoquin® genannten hinauszugehen. Auch wenn sie in der Studie als unerwünschte Pergolidwirkungen aufgeführt sind, sind einige Symptome nach aktuellem Wissensstand nur schwer mit der Pergolidgabe in Verbindung zu bringen wie z.B. Lahmheiten, Hufrehe, Zahnprobleme oder Hautabszesse. Der Autorin erscheint wahrscheinlicher, dass die Verfasser der NADA 141-331 (2011) sämtliche klinische Auffälligkeiten und Erkrankungen der Pferde in dem halbjährlichen Zeitraum erfasst und als potentielle Nebenwirkungen des Pergolids benannt haben. Viele der oben genannten Symptome wie z.B. Lethargie, Gewichtsverlust, Hufrehe, Verhaltensänderungen und potentielle Infektionen wie Abszesse sind mögliche klinische Auffälligkeiten bei an PPID erkrankten Pferden und sind somit vielmehr in Zusammenhang mit dem Erkrankungsbild zu bringen. Es scheint also möglich, dass zumindest ein Teil der in der Feldstudie der NADA 141-331 (2011) genannten unerwünschten Arzneimittelwirkungen als klinische Symptome bei den älteren PPID-Patienten anzusehen sind. In der eigenen Studie zeigten die Probanden 2 und 3 vorübergehendes und selbstlimitierendes Kotwasser während der Therapie mit Pergolid. Während Diarrhö mehrmals als Nebenwirkung erwähnt wird (Pongratz et al. 2010, Dunkel et al. 2014) und in den Untersuchungen der NADA 141-331 (2011) mit einer Häufigkeit von 9,8 % angegeben ist, wurde das Symptom Kotwasser nach Kenntnisstand der Autorin nur bei einem Pferd in einer Langzeitstudie zum Pergolid (n = 38) beschrieben (Pongratz et al. 2010). Die Probanden 2 und 3 standen zum Zeitpunkt der Studie im gleichen Stall und da die Besitzer von einer kurzfasrigen Heucharge zu diesem Zeitpunkt berichteten, war ein Zusammenhang mit der Raufutterqualität naheliegend. Dennoch scheint Kotwasser als seltenes und mildes Symptom der Pergolidtherapie möglich. Proband 2 fiel außerdem 16 Tage nach Therapiestart mit milden Kolikanzeichen auf. Koliksymptome wurden in der Feldstudie der NADA 141-331 (2011) ebenfalls bei 9,8 % (12/122) der Probanden dokumentiert, wobei drei der zwölf

DISKUSSION

Pferde schwerwiegende Koliken aufgrund von Darmverschlüssen zeigten und für die Autoren nicht wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Pergolidtherapie standen (Andrews et al. 2011). Die milde Kolik von Proband 2 könnte daher eine mögliche Reaktion auf die Tabletten gewesen sein. Allerdings lässt sich eine Kolik aufgrund anderer Ursachen bei dem Pony nicht ausschließen, da die Stute rezidivierend an Koliken litt. Proband 3 zeigte in den ersten Wochen nach Therapiestart für die Besitzer eine vermehrte Tränkeaufnahme und einen vermehrten Harnabsatz. Laut Besitzern trank der PRE Wallach an einzelnen Tagen ca. 40 l Wasser pro Tag. Laut Definition ist eine Polydipsie eine Tränkeaufnahme von > 100 ml/kg Körpergewicht in 24 Stunden, was bei dem ca. 660 kg schweren Wallach einer Menge von 66 l pro Tag entsprechen würde. Auch wenn definitionsgemäß keine Polydipsie vorlag, war den Besitzern dennoch eine Veränderung der Tränkeaufnahme- und Harnabsatzmenge aufgefallen. Außerdem zeigte der Wallach 26 Tage nach Therapiestart mit Pergolid leicht diffus geschwollene distale Gliedmaßen und Bewegungsunlust. Der Entzündungsparameter SAA war mit 348 µg/ml leicht erhöht, wobei die Symptomatik nach kurzer Zeit selbstlimitierend verschwand. Nach Kenntnis der Autorin wurden bislang Polyurie/Polydipsie bzw. Schwellungen der Gliedmaßen nicht als unerwünschte Pergolidwirkung beschrieben. Die gezeigte Symptomatik ließ sich mithilfe der durchgeführten klinischen und labordiagnostischen Untersuchungen nicht näher eingrenzen, weshalb ein Infekt vermutet wurde. Dass die Symptome eine Folge der Pergolidtherapie waren, erscheint der Autorin unwahrscheinlich. Proband 18 zeigte im Rahmen der Pergolid-Phase ebenfalls Auffälligkeiten wie apathisches Verhalten und Schwitzen. Beide Symptome sind als mögliche unerwünschte Arzneimittelwirkungen vom Hersteller genannt. Da der Proband im Rahmen des letzten TRH-Stimulationstests extrem angestiegene ACTH-Konzentrationen aufwies und kurz nach Beendigung der Studie aufgrund einer zunehmenden Verschlechterung des Allgemeinbefindens euthanasiert werden musste, lag bei diesem Pferd ein besonderer Verlauf vor. Der Fall wurde im Kapitel 4.3.4 bereits ausführlich diskutiert, weshalb hier nicht weiter darauf eingegangen wird.

5 SCHLUSSFOLGERUNGEN

1. Die Verwendung von 0,5 µg/kg TRH im Vergleich zu 2 µg/kg TRH (abgeleitet von 1 mg TRH pro Pferd mit 500 kg Körpergewicht) führt nicht zu statistisch signifikant niedrigeren ACTH-AUCs, Basal- und Zehnminutenwerten bei mindestens 15 Jahre alten Pferden. Allerdings wiesen die ACTH-Werte 30 Minuten nach 0,5 µg/kg TRH signifikant ($p = 0,0005$) niedrigere Konzentrationen im Vergleich mit 2 µg/kg TRH auf. Daher eignet sich die Nutzung der ACTH-Dreißigminutenwerte nach Gabe von 0,5 µg/kg TRH nicht zur Beurteilung und Diagnosestellung bei potenziell an PPID erkrankten Pferden.
2. Die vier- bis sechswöchige Therapie mit Pergolid zeigte bei Probanden mit initialen ACTH-Basalwerten ≤ 35 pg/ml und ACTH-Zehnminutenwerten zwischen 125 und 1170 pg/ml keine statistisch signifikante Reduktion der ACTH-Ausschüttung. Weitere (Langzeit-)Studien zur frühen klinischen und labordiagnostischen Erkennung einer PPID, dem natürlichen Verlauf und zur Therapie sind nötig, um den möglichen Nutzen einer frühen Pergolidtherapie besser abschätzen zu können. Daher empfiehlt sich beim Anpassen von Pergolid Dosen im Rahmen von Therapiekontrolle auf Grundlage von TRH-stimulierten ACTH-Werten Vorsicht bzw. erscheint der Nutzen zum aktuellen Zeitpunkt wenig sinnvoll.
3. Aus den Ergebnissen von TRH-Stimulationstests bei Pferden mit basalen ACTH-Werten im *PPID unlikely* oder *equivocal* Bereich können nach derzeitigem Kenntnisstand keine Empfehlungen zur Anpassung der Pergolid Dosis abgeleitet werden.
4. Die TRH-Dosierung von 0,5 µg/kg führte im Vergleich zu 2 µg/kg TRH nicht zu verminderten unerwünschten Arzneimittelwirkungen außer beim Symptom „Gähnen“. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen traten regelmäßig in den ersten 15 Minuten nach der intravenösen TRH-Injektion auf, waren aber sehr mild und transient.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Der TRH-Stimulationstest wird zur Diagnostik der Pituitary Pars intermedia Dysfunction (PPID) genutzt und üblicherweise mit 1 mg TRH pro Pferd (entspricht 2 µg/kg bei 500 kg KGW) dosiert. Das Hauptziel dieser Studie war es, die ACTH-Ausschüttungen nach 0,5 bzw. 2 µg/kg TRH bei mindestens 15 Jahre alten Pferden und Ponys zu vergleichen (TRH-Dosisvergleich). In einem weiteren Schritt sollte – Placebo-kontrolliert - der Effekt einer vier- bis sechswöchigen Therapie mit Pergolid auf die Ergebnisse des TRH-Stimulationstests untersucht werden (Therapiestudie).

An der prospektiven, randomisierten Cross-over-Dosisvergleich-Studie haben 18 Pferde und Ponys (19,9 ± 4,1 Jahre) teilgenommen. Als Einschlusskriterium galt ein Mindestalter von 15 Jahren. Alle erhielten 0,5 und 2,0 µg/kg TRH (TRH Ferring, Kiel) intravenös in randomisierter Reihenfolge und mit einer Wash-out-Phase von 10-14 Tagen. Die ACTH-Messungen erfolgten direkt vor (0) und 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 Minuten nach TRH-Injektion. Für die Statistik wurde ein linear gemischtes Modell mit den fixen Effekten „Sequenz“ (0,5/2 oder 2/0,5), „Periode“ (erste oder zweite TRH Gabe) sowie „TRH-Dosis“ (0,5 oder 2,0 µg/kg) und mit dem Zufallseffekt „Individuum“ gewählt. Als Hauptzielparameter wurden die Flächen unter den ACTH-Kurven (Areas under the curves, AUCs) von 0 bis 120 Minuten nach TRH-Injektion berechnet. Zudem wurden die ACTH-Werte zu den Zeitpunkten 0, 10 und 30 Minuten nach TRH sowie die Maximalwerte und der Zeitpunkt ihres Auftretens auf signifikante Unterschiede geprüft.

Im Dosisvergleich zwischen 0,5 und 2 µg/kg TRH ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der ACTH-AUCs, Basal-, Zehnminuten- und Maximalwerte. Allerdings wiesen die ACTH-Dreißigminutenwerte nach 0,5 µg/kg TRH eine hochsignifikante Reduktion auf ($p = 0,0005$). Es wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Sequenz und Periode festgestellt.

Somit erscheinen 0,5 µg/kg TRH ausreichend für die PPID-Diagnostik bei Verwendung der ACTH-Zehnminutenwerte. Allerdings gab es in den Medianen eine Tendenz zu niedrigeren Werten nach der geringeren TRH-Dosis. Für die Diagnosestellung mittels

ZUSAMMENFASSUNG

ACTH-Dreißigminutenwerten sollte die TRH-Dosierung von 0,5 µg/kg grundsätzlich nicht angewandt werden, da dies falsch zu niedrige Ergebnisse ergeben kann.

Auf Grundlage ihrer Ergebnisse im TRH-Dosisvergleichstest mit 2 µg/kg TRH nahmen 13 Probanden ($19,8 \pm 4,5$ Jahre) an der prospektiven, Placebo-kontrollierten Therapiestudie teil. Als Einschlusskriterium musste ein ACTH-Wert 10 Minuten nach 2 µg/kg TRH von mindestens 100 pg/ml vorliegen. Die Pferde lagen also entsprechend der Empfehlungen der Equine Endocrinology Group (2023) hinsichtlich ihres PPID-Status entweder in der *Interpretive Zone* oder in der Kategorie *PPID likely*. Die Probanden erhielten zunächst vier bis sechs Wochen ein Placebo und danach für den gleichen Zeitraum den zugelassenen Wirkstoff Pergolid in der empfohlenen Dosis von 2 µg/kg. Jeweils nach der Placebo- bzw. Pergolidgabe wurden erneute TRH-Stimulationstests mit der TRH-Dosierung von 2 µg/kg durchgeführt. Für die statistischen Berechnungen erfolgte ein t-Test für gepaarte Stichproben. Es wurden die ACTH-AUCs sowie die ACTH-Werte zum Zeitpunkt 0, 10 und 30 Minuten nach TRH, die Maximalwerte und der Zeitpunkt ihres Auftretens nach Placebo- und Pergolidgabe verglichen. Des Weiteren wurden die Ergebnisse nach dem initialen TRH-Test mit jenen nach Placebo- bzw. Pergolidgabe auf signifikante Unterschiede geprüft.

Trotz Therapie mit Pergolid ergaben sich beim Vergleich der ACTH-Werte (post Placebo mit post Pergolid, initial mit post Pergolid sowie initial mit post Placebo) ganz überwiegend keine signifikanten Unterschiede. Lediglich bei den ACTH-Zehnminutenwerten zeigten sich signifikant ($p = 0,04$) niedrigere Werte nach Placebo ($\log_{10_ACTH_{10\text{ min}}}: 2,39 \pm 0,31$ pg/ml) als initial ($\log_{10_ACTH_{10\text{ min}}}: 2,47 \pm 0,25$ pg/ml).

In anderen Studien konnten positive Effekte des Pergolids vor allem auf erhöhte basale ACTH-Konzentrationen bei an PPID erkrankten Pferden gezeigt werden. Auch 5 der 13 eigenen Probanden erreichten eine bessere PPID-Kategorie, wenn ihr ACTH-Zehnminutenwert ausgewertet wurde. Die fehlenden signifikant niedrigeren, durch TRH stimulierten ACTH-Werte nach der vier- bis sechswöchigen Pergolidgabe führen dazu, dass eine Therapiekontrolle oder Pergoliddosisanpassung anhand der Ergebnisse des TRH-Stimulationstests nicht sinnvoll erscheint.

7 SUMMARY

The TRH stimulation test is used to diagnose pituitary pars intermedia dysfunction (PPID) and is usually dosed with 1 mg TRH per horse (equivalent to 2 µg/kg at 500 kg bw). The main objective of this study was to compare ACTH release after 0.5 or 2 µg/kg TRH in horses and ponies aged at least 15 years (TRH dose comparison). In a further step, the effect of a four- to six-week treatment with pergolide on the results of the TRH stimulation test was to be investigated in a placebo-controlled manner (therapy study).

In the prospective, randomised cross-over dose comparison study, 18 horses and ponies (19.9 ± 4.1 years) participated. The inclusion criterion was a minimum age of 15 years. All received 0.5 and 2 µg/kg TRH (TRH Ferring, Kiel) intravenously in randomised order and with a wash-out phase of 10-14 days. ACTH measurements were taken immediately before (0) and 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 minutes after TRH injection. A linear mixed model with the fixed effects 'sequence' (0.5/2 or 2/0.5), 'period' (first or second TRH administration) and 'TRH dose' (0.5 or 2.0 µg/kg) and with the random effect 'individual' was selected for the statistics. The areas under the curves (AUCs) from 0 to 120 minutes after TRH injection were calculated as the main target parameters. In addition, the ACTH values at 0, 10 and 30 minutes after TRH as well as the maximum values and the time of their occurrence were tested for significant differences.

In the dose comparison between 0.5 and 2 µg/kg TRH, there were no significant differences in the ACTH AUCs, basal, ten-minute and maximum values. However, the ACTH thirty-minute values showed a highly significant reduction after 0.5 µg/kg TRH ($p = 0.0005$). No significant differences were found with regard to sequence and period.

Thus, 0.5 µg/kg TRH appears to be sufficient for PPID diagnostics when using the ACTH ten-minute values. However, there was a tendency in the medians towards lower values after the lower TRH dose. The TRH dose of 0.5 µg/kg should generally not be used for diagnosis using ACTH thirty-minute values, as this can lead to falsely low results.

Based on their results in the TRH dose comparison test with 2 µg/kg TRH, 13 subjects (19.8 ± 4.5 years) took part in the prospective, placebo-controlled therapy study. The inclusion criterion was an ACTH value of at least 100 pg/ml 10 minutes after 2 µg/kg

SUMMARY

TRH. The horses were therefore either in the *interpretive zone* or in the *PPID likely* category according to the recommendations of the Equine Endocrinology Group (2023) with regard to their PPID status. The test subjects initially received a placebo for four to six weeks and then the authorised active ingredient pergolide at the recommended dose of 2 µg/kg for the same period. Each time after the placebo or pergolide administration, new TRH stimulation tests were carried out with the TRH dosage of 2 µg/kg. A paired samples t-test was used for the statistical calculations. The ACTH AUCs and the ACTH values at 0, 10 and 30 minutes after TRH, the maximum values and the time of their occurrence after placebo and pergolide administration were compared. In addition, the results after the initial TRH test were compared with those after placebo and pergolide for significant differences.

Despite treatment with pergolide, the comparison of ACTH values (post placebo with post pergolide, initial with post pergolide and initial with post placebo) showed no significant differences for the most part. Only the ACTH ten-minute values were significantly ($p = 0.04$) lower after placebo ($\log_{10_ACTH10 \text{ min}}: 2.39 \pm 0.31 \text{ pg/ml}$) than initially ($\log_{10_ACTH10 \text{ min}}: 2.47 \pm 0.25 \text{ pg/ml}$).

Other studies have shown positive effects of pergolide, particularly on increased basal ACTH concentrations in horses suffering from PPID. Five of the 13 own test subjects also achieved a better PPID category when their ACTH ten-minute values were analysed. The lack of significantly lower ACTH levels stimulated by TRH after four to six weeks of pergolide administration means that a therapy control or pergolide dose adjustment based on the results of the TRH stimulation test does not appear to be useful.

Die Zusammenfassung wurde mittels DeepL Translate ins Englische übersetzt und durch die Autorin korrigiert.

8 ANHANG

8.1 KLINISCHES SCORE-SYSTEM

Auf den folgenden sechs Seiten ist das selbst entwickelte klinische Score-System dargestellt.

ANHANG

Klinisches Score-System „Pituitary Pars intermedia Dysfunktion“

Datum: _____
Besitzer (Nachname, Vorname): _____
Pferd (Name, Rasse, Alter, Geschlecht): _____

Teilscores	Gesamtpunktzahl	maximal erreichbare Punktzahl
1. PPID		39/40
2. Hufrehe		17
3. Adipositas		6
Gesamtscore (Summe)		62/63

Erläuterungen:

Gradeinteilung / Punktevergabe Scores:

- Grad 0 = Symptom nicht vorhanden → 0 Punkte
- Grad 1 = Symptom geringgradig (ggr.) vorhanden → 1 Punkt
- Grad 2 = Symptom mittelgradig (mgr.) vorhanden → 2 Punkte
- Grad 3 = Symptom hochgradig (hgr.) vorhanden → 3 Punkte

Ausprägungsgrad des jeweiligen Krankheitsbildes (PPID/Hufrehe/Adipositas) in Abhängigkeit von der erreichten Gesamtpunktzahl in den Teilscores:

	kein/e	geringgradig	mittelgradig	hochgradig
PPID	0	1-13	14-26	27-40
Hufrehe	0	1-5	6-10	11-17
Adipositas	0	1-2	3-4	5-6

Klinisches Score-System „Pituitary Pars intermedia Dysfunction“

Erläuterung: Symptom Hypertrichose

- **Hypertrichose:** Fellveränderungen im Bezug auf eine vermehrte Haarlänge, möglicherweise mit vermehrter Lockung der Haare einhergehend, die lokal oder generalisiert auftreten können (infolge persistierender Haarfollikel)
- pathognomonisch → 95% aller Pferde mit **generalisierter** Hypertrichose haben Erkrankung der Hypophyse¹

Frage vorab: Zeigt das Pferd Veränderungen im Fell / Haarkleid?

- Ja → welche?
-
-
-

Nein

Unklar, nicht entscheidbar

↓

1. generalisierte Hypertrichose (vermehrte Haarlänge, Lockung) → klinische Diagnose „PPID“ → Labordiagnostik, Therapie einleiten
2. regionale Hypertrichose / keine Fellveränderungen / unklar → klinisches Score-System durchführen

Anmerkung: im Folgenden mit * gekennzeichnete Symptome sind variabel und somit an jedem Testtag neu zu bestimmen

¹ Schwarz B, (2017): Hypertrichose (Hirsutismus), In: Gehlen H: Differentialdiagnosen Innere Medizin beim Pferd, 1. Aufl., Enke Verlag, 258.

ANHANG

Teilscore PPID	Symptom	Ausprägung			0-3 Punkte eintragen
		Grad 1 (geringgradig)	Grad 2 (mittelgradig)	Grad 3 (hochgradig)	
a. Vorbericht	Fellwechsel- störung	Wo? (Dokumentation) (z.B. an Gliedmaßen, Kopf, Stamm)	fokal (< 1/3 der Körperoberfläche)	ca. ½ der Körperoberfläche	generalisiert
		Dauer?	Phase des Fellwechsels dauert bis zu 4 Wochen länger als gewohnt bzw. im Vergleich zu anderen Pferden (leicht verzögert)	Phase des Fellwechsels dauert bis zu 3 Monate länger (deutlich verzögert)	ausbleibender Fellwechsel
	Seit wann?	seit einem Jahr	seit 2-3 Jahren	länger als 3 Jahre	
	Verhaltens- änderung*	Mattigkeit* Ausprägung? *	etwas zu ruhig	deutlich ruhiger als gewohnt	depressives, lethargisches Verhalten, für den Besitzer nicht wiederzuerkennen immer
	Aufregung* Ausprägung? *	selten, an einzelnen Tagen etwas unruhig	häufig (z.B. wochenweise) deutlich angespannt und nervös	stark aufgeregt und/oder schreckhaftes Verhalten, für den Besitzer nicht wiederzuerkennen immer	
	Dauer**	selten, an einzelnen Tagen	häufig (z.B. wochenweise)	immer	

ANHANG

	erhöhte Infektanfälligkeit / wiederkehrende Infektionen (z.B. Sinusitis, Dermatitis, Synovitis, Hufabszess, Infektion des Atem-/Harntrakts oder der Augen)	1 x im Jahr erkrankt	2-3 x im Jahr erkrankt	> 3 x im Jahr erkrankt
b. Klinisch	Supraorbitale Fettdépôts* (Kopfhaltung oberhalb der Widerristhöhe)	leicht erhabenes Dépôt, dass noch innerhalb der supraorbitalen Kuhle liegt	deutlich erhaben, etwa auf einer Höhe mit der knöchernen Orbita	starke Vorwölbung, die über die knöcherne Orbita hinaus geht
	Muskelstatus*	leichte/beginnende Atrophie der Rückenmuskulatur	deutliche Atrophie der Rückenmuskulatur	Rückenmuskulatur stark atrophisch, knöcherne Wirbelsäule deutlich hervortretend
	Muskelabbau Rücken (Sattellage)*	leichter/beginnender Hängebauch	deutlicher Hängebauch	sehr starker Hängebauch
c. Sonstige Auffälligkeiten	regionale Hypertrichose			
	Leistungsschwäche*			
	Hyperhidrose (generalisiert/fokal) = vermehrtes Schwitzen*			
	Polyurie/Polydipsie = vermehrter Harnabsatz, vermehrte Tränkeaufnahme*			
	Durchtrittigkeit			
Ja? 1 Punkt Nein? 0 Punkte	Stuten: vermehrte Euterfüllung* neurologische Auffälligkeiten*			
Gesamtpunktzahl Teilscore PPID:				

ANHANG

Vorbericht vorab:

- Hatte das Pferd schon mal Hufrehe? Ja Nein
- Wann waren die Hufreheschübe? Wie lange hat ein Schub ange dauert?
- War eine Ursache für die Entstehung der Hufrehe bekannt?
- Wurde eine Senkung oder Rotation des Hufbeins mittels Röntgen diagnostiziert?

Anmerkung: Im folgenden Hufrehe Score ist bei **b. Klinisch** zu beachten, dass immer der stärkste Befund in die Bewertung mit eingeht, falls es unterschiedlich starke Befunde zwischen einzelnen Hufen geben sollte. Welche Gliedmaßen wie stark betroffen sind, soll unterhalb der Score Tabelle dokumentiert werden.

Teilscore Hufrehe	Symptom	Ausprägung			0-3 Punkte eintragen
		Grad 1 (geringgradig)	Grad 2 (mittelgradig)	Grad 3 (hochgradig)	
a. Vorbericht	bisherige Hufreheschübe	Anzahl			
		Ausprägung	ein Schub milder oder schleichender Verlauf, leichte Lahmheit oder Bewegungsunlust	2 Schübe deutliche Lahmheit und Schmerzhaftigkeit, Pferd bewegte sich deutlich weniger als normal	≥ 3 Schübe stark lahm, hgr. schmerzhaft, Pferd bewegte sich nur nach Aufforderung
b. Klinisch	vermehrte digitale Pulsation*	ggr.	mgr.	hgr.	
	Wendeschmerz*	ggr.	mgr.	hgr.	
	Trachtenfußung*	ggr.	mgr.	hgr.	
	divergierende Hufrehe	Ja? (1 Punkt) oder Nein? (0 Punkte)			
	verbreiterte Weiße Linie	Ja? (1 Punkt) oder Nein? (0 Punkte)			
Gesamtpunktzahl Teilscore Hufrehe:					

ANHANG

Teilscore Adipositas	Symptom	Ausprägung			0-3 Punkte eintragen
		Grad 1 (geringgradig)	Grad 2 (mittelgradig)	Grad 3 (hochgradig)	
a. Klinisch	generalisierte Adipositas mittels Body Condition Score (BCS) nach Henneke*	BCS Grad 6	BCS Grad 7-8	BCS Grad 9	
	regionale Adipositas mittels Cresty Neck Score (CNS) nach Carter*	CNS Grad 1-2	CNS Grad 3	CNS Grad 4-5	
Gesamtpunktzahl Adipositas Score					

BCS (aktuell): _____

CNS (aktuell): _____

Frage: Wurde bereits eine Insulindysregulation diagnostiziert? Wenn ja, wann und mit welchem Testverfahren?

Anmerkung: Adipöse Pferde und Ponys und solche mit einem CNS > 3 zeigen eine erhöhte Wahrscheinlichkeit an einer Insulinresistenz zu erkranken und besitzen zudem ein erhöhtes Hufreherisiko.²

² Ertelt A, Gehlen H, (2017): Krankheiten des endokrinen Pankreas, Equines metabolisches Syndrom, In: Brehm W, Gehlen H, Ohnesorge B, Wehrend A: Handbuch Pferdepraxis, 4. Aufl, Enke Verlag, 841-842.

8.2 KENNZAHLEN ANALYSEGERÄTE

Die folgenden Angaben stammen vom Hersteller Siemens Healthineers der Analysegeräte und sind den Testanleitungen entnommen.

8.2.1 Immulite® 2000 XPI ACTH

Tab. 16: Intraassay-Präzision (pg/ml): Statistik aus einem einzelnen Testansatz mit 20 wiederholten Einzelmessungen von 5 Proben (Herstellerangaben in Testanleitung, Siemens)

	Mittelwert	Standardabweichung	Variationskoeffizient
1	23	2,0	8,7 %
2	30	2,0	6,7 %
3	40	2,7	6,8 %
4	208	14,3	6,9 %
5	421	39,8	9,5 %

Tab. 17: Interassay-Präzision (pg/ml): Statistik aus 8 verschiedenen Testansätzen von 5 Proben (Herstellerangaben in Testanleitung, Siemens)

	Mittelwert	Standardbereich	Variationskoeffizient
1	24	2,4	10,0 %
2	44	3,6	8,2 %
3	89	7,7	8,7 %
4	229	21,3	9,3 %
5	496	30,0	6,1 %

ANHANG

Tab. 18: Spezifität: Proben mit scheinbaren ACTH-Konzentrationen von 0 pg/ml zeigten eine gewisse Kreuzreaktivität mit zugegebenen ACTH-Fragmenten (1-18, 1-24, 18-39) und Alpha-MSH. Diese Substanzen zeigten eine Bindung an die Antikörper des Tests, was zu einem Anstieg der scheinbaren ACTH-Konzentration in der Probe führte.

Substanz	Zugegebene Menge (pg/ml)	Kreuzreaktivität (%)
ACTH (1-18)	500	NN
	5.000	NN
	50.000	0,01
	500.000	0,001
ACTH (1-24) (= Cosyntropin)	500	1
	5.000	0,5
	50.000	0,2
	500.000	0,04
ACTH (18-39)	500	17,3
	5.000	16,6
Alpha-MSH	500	NN
	5.000	NN
	50.000	0,01
	500.000	NN

NN: nicht nachweisbar

Tab. 19: Interferenzen: Einfluss möglicher Probeninhaltsstoffe auf Messergebnisse

Proben	Konzentration	Änderung des Ergebnisses
Bilirubin	Bis 200 mg/l	Kein Einfluss
Biotin	1500 ng/ml	≤ 10 %
Hämoglobin	Bis 512 mg/dl	Kein Einfluss
Triglyceride	Bis 5.000 mg/dl	Kein Einfluss

Methodenvergleich: Die Assays des Immulite® 2000 und des Immulite® (Konzentrationsbereich ca. 20 – 1200 pg/ml) wurden durch die Messung von 86 Patientenproben miteinander verglichen. Dies ergab eine lineare Regression:

- (IML 2000) = 0,95 (IML) + 2,9 pg/ml
- Korrelationskoeffizient (r) = 0,988
- Mittelwerte: 241 pg/ml (Immulite® 2000) und 252 pg/ml (Immulite®).

8.2.2 ADVIA Centaur® XP Insulin

Tab. 20: Spezifität: Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität des ADVIA Centaur® Insulin-Tests wurden Serumproben folgende Substanzen in angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Die Substanzen hatten keinen signifikanten Effekt auf die Insulinmessung.

Substanz	Zugegebene Menge	Mittlere Wiederfindung in %
Proinsulin	1 µg/ml	100,8
C-Peptid	500 ng/ml	95,1
Gastrin-1	1 µg/ml	96,6
Glukagon	1 µg/ml	100,2
Sekretin	1 µg/ml	101,6

Tab. 21: Präzision: 3 baugleiche ADVIA Centaur® Systeme, die Anzahl der zur Berechnung der Präzision herangezogenen Einzelmessungen beträgt n = 72 für jede Probe, über einen Zeitraum von 4 Tagen, mit folgenden Ergebnissen:

Insulin Mittelwert (mU/l)	Intra-Assay % VK	Inter-Assay % VK	Gesamt % VK
14,68	4,6	5,9	7,5
45,72	3,2	2,6	6,5
124,51	3,3	4,8	6,3

Tab. 22: Interferenzen: Einfluss in angegebener Menge zugesetzter Probenbestandteile auf Insulinwerte

Folgende Serumproben...	Weisen ≤ 6 % Änderungen der Ergebnisse auf bis zu ...
Hämolytisch	125 mg/dl Hämoglobin (= 6,9 mmol/l)
Lipämisch	1000 mg/dl Lipid (= 55,5 mmol/l)
Ikterisch	20 mg/dl Bilirubin (= 340 µmol/l)
Proteinämisch	12 g/dl Protein (= 120 g/l)

Methodenvergleich: Der ADVIA Centaur® Insulin-Test wurde mit einer alternativen Methode (Konzentrationsbereich: 1,1 und 319,1 mU/l) durch die Messung von 328 Serumproben miteinander verglichen:

- ADVIA Centaur® Insulin = 0,95 (alternative Methode) – 0,46 mU/l
- Korrelationskoeffizient (r) = 0,990.

8.3 WEITERE ERGEBNISSE

8.3.1 Klinische Voruntersuchungen

Am häufigsten fielen Veränderungen im Respirationstrakt auf. Bei fünf Pferden wurden auskultatorisch verschärfte Lungengeräusche festgestellt. Vier Pferde zeigten zudem Sekrettrinnen, bei Zweien konnte Husten ausgelöst werden und ein Pferd zeigte einen abdominal betonten Atemtyp. Bei fünf Pferden wurden vergrößerte Mandibularlymphknoten festgestellt. Diese zeigten sich bei allen Probanden verschieblich und waren nicht schmerzhaft. Daneben gab es zwei Pferde mit einseitigem Anophthalmus und ein Pferd mit Augenausfluss. Bei Proband 16 wurden ein holosystolisches Herzgeräusch, wechselnde Kotkonsistenz und lokal schuppige bis krustige Hautveränderungen an einem Röhrein festgestellt. Ein Schimmel zeigte mehrere Umfangsvermehrungen (vermutlich Melanome) an der Schweifrübe, am Anus und im Bereich der Kiefergelenke.

Die klinisch auffälligen Befunde der einzelnen Probanden in der Voruntersuchung sind in Tab. 23 aufgeführt.

ANHANG

Tab. 23: Klinisch auffällige Befunde in den Voruntersuchungen

Proband	Klinische Befunde der Voruntersuchungen	Lokalisation und Grad
1	Sekretinnen	Bds. ggr.
2	Sekretinnen	Bds. mgr.
3	Vergrößerte Mandibularlymphknoten	Bds. mgr.
4	Anophthalmus, verschärfte Lungengeräusche bei Auskultation	Links Rechts mgr.
7	Verschärfte Lungengeräusche bei Auskultation	Rechts ggr.
8	Einzelner Hustenstoß auslösbar, verschärfte Lungengeräusche bei Auskultation	Rechts mgr., links ggr.
9	Vergrößerte Mandibularlymphknoten, verschärfte Lungengeräusche bei Auskultation	Bds. mgr. Bds. mgr.
10	Verschärfte Lungengeräusche bei Auskultation	Bds. ggr.
12	Sekretinnen Anophthalmus	Bds. mgr. Links
14	Seröser Augenausfluss, vergrößerter Mandibularlymphknoten	Rechts ggr. Rechts mgr.
15	Zwei Hustenstöße auslösbar	
16	Sekretinnen, vergrößerte Mandibularlymphknoten, Holosystolikum links Grad 3/6, wechselnde Kotkonsistenz, schuppig-krustige Haut an einem Rührbein	Bds. ggr. Links mgr., rechts ggr. Rechtes Hinterbein
17	Vergrößerter Mandibularlymphknoten, ggr. abdominal betonte Atmung	Links ggr.
18	Multiple Melanome an Schweifrübe, Anus, derbe Umfangsvermehrungen am Kopf in Höhe der Kiefergelenke	

bds.: beidseits

8.3.2 Labordiagnostische Voruntersuchungen

Tab. 24: Laborparameter, die im Rahmen der Voruntersuchungen bestimmt wurden

Hämatologie (ADVIA 2120, Siemens)	Klinische Chemie (PENTRA 400, Axon lab)
- Leukozyten	- Harnstoff
- Neutrophile Granulozyten	- Kreatinin
- Eosinophile Granulozyten	- Natrium ionisiert
- Basophile Granulozyten	- Chlorid
- Lymphozyten	- Kalium ionisiert
- Monozyten	- Kalzium ionisiert
- Große ungefärbte Zellen (LUC): undifferenzierte Zellen	- Phosphor
- Erythrozyten	- Magnesium ionisiert
- Hämoglobin	- Gesamteiweiß
- Hämatokrit	- Albumin
- MCV = Mittleres korpuskuläres Erythrozyteneinzelvolumen	- Globulin
- RDW = Erythrozytenverteilungsbreite	- Bilirubin gesamt
- MCH = Mittleres korpuskuläres Hämoglobin	- Bilirubin direkt
- MCHC = Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration	- Alkalische Phosphatase
- Retikulozyten	- Glutamatdehydrogenase
- Hämoglobin Retikulozyten (CHR)	- Gamma-Glutamyl-Transferase
- Thrombozyten	- Aspartat-Amino-Transferase
- Große Thrombozyten	- Creatinkinase
- Granularität der Thrombozyten	- Laktat-Dehydrogenase
- Thrombozyten-Aggregate	- Fibrinogen
- Thrombokrit	- Eisen
	- Serum-Amyloid-A

Eine 21-jährige Ponystute (Proband 2) zeigte in der Hämatologie eine leicht herabgesetzte Thrombozytenanzahl von $73 \times 10^9/l$ (Referenzbereich: $80-230 \times 10^9/l$) sowie vereinzelte Thrombozytenaggregate im Blutausstrich. Proband 13 und 14, zwei Ponys, die aus gleicher Haltung stammten, fielen bei klinisch ungestörtem Allgemeinbefinden mit erhöhten (Leber-)Enzymen auf (Tab. 25).

ANHANG

Tab. 25: Enzymaktivitäten und Gallensäuren der Probanden 13 und 14; obere Grenzwerte in Klammern angegeben

	Datum	AP (< 260 U/l)	GLDH (< 145 U/l)	γ-GT (< 140 U/l)	Gallensäuren (μmol/l)*
Proband 13	11.11.21	337	207	363	
	29.11.21	199	3	205	2,3
	05.03.22	83	5	37	
Proband 14	11.11.21	300	53	199	
	29.11.21	246	2	113	5,6

AP: Alkalische Phosphatase, GLDH: Glutamatdehydrogenase,

γ-GT: Gamma-Glutamyl-Transferase

*kein laboreigener Referenzbereich vorhanden; Gallensäuren > 20 μmol/l sind prognostisch relevanter Parameter für das Nicht-Überleben (Dunkel et al. 2015) bzw. für schlechte Prognose (Durham et al. 2003)

Daraufhin wurde nach 2,5 Wochen bei beiden Ponys eine zweite vollständige Voruntersuchung inklusive der labordiagnostischen Bestimmung der Gallensäuren zum Ausschluss einer Leberfunktionsstörung durchgeführt. Beide wiesen niedrige Gallensäuren auf und lediglich Proband 13 zeigte noch einen erhöhten γ-GT-Wert von 205 U/l, woraufhin die Probanden an der Studie teilnahmen. Bei Proband 13 wurden am Ende der Studie, nach über fünf Wochen Pergolidtherapie, die Blutwerte erneut kontrolliert. Am 05.03.2022 lagen alle Enzymaktivitäten inklusive der γ-GT (37 U/l) unterhalb der Grenzwerte. Das direkte und gesamte Bilirubin befand sich an allen Zeitpunkten bei beiden Probanden in der Norm.

Bei Proband 17, einem 29-jährigen Warmblutwallach, wurde ein geringgradig erhöhter Kreatininwert von 152,5 μmol/l (Grenzwert: 146,7 μmol/l) sowie ein geringgradig erniedrigtes Albumin von 26,8 g/l (Referenzbereich: 27,4 bis 35,7 g/l) festgestellt. Das Pferd zeigte einen schlechten Ernährungszustand, aber weder eine Polyurie/Polydipsie noch ein reduziertes Allgemeinbefinden. Daher wurde es als Studienteilnehmer eingeschlossen. 17 Tage später, vor Beginn der Therapiestudie, wurden die Werte am 19.02.2022 überprüft. Beide Parameter lagen knapp im Normalbereich (Kreatinin: 142,9 μmol/l, Albumin: 27,9 g/l). Somit nahm der Proband auch an der Therapiestudie teil.

Proband 18, ein 28-jähriger Araberwallach, fiel bei der Laboruntersuchung mit einer EDTA-induzierten Thrombozytopenie von 5 G/l (Referenzbereich: 80-230 G/l) auf. Die

ANHANG

hämatologische Kontrolle aus Zitrat-Blut zeigte, dass die Thrombozyten im Normalbereich (114 G/l) lagen. Der Albuminwert war bei diesem Pferd minimal erniedrigt (27,2 g/l).

8.3.3 Klinische Untersuchungen an den Testtagen

Tab. 26: Klinische Auffälligkeiten, die über die Befunde, die bei den Voruntersuchungen erhoben wurden, hinaus gingen bzw. davon abwichen

Proband	Testtag	Klinische Befunde
1	1	Bds. ggr. seröser Nasenausfluss
	2	Bds. ggr. seröser Nasenausfluss, Herzrhythmus regelmäßig unregelmäßig, einzelne kleine rundliche Hauterhabenheiten an linker Schulter
	3	Bds. ggr. seröser Nasenausfluss, Herzrhythmus regelmäßig unregelmäßig
	4	Linker Mandibularlymphknoten ggr. vergrößert, Lahmheit vorne rechts (Hufgelenksarthrose)
2	1	Rechter Mandibularlymphknoten ggr. vergrößert
	3	Rechter Mandibularlymphknoten ggr. vergrößert, kleine Hautabschürfung an rechter Crista facialis
	4	Bds. ggr. seröser Nasenausfluss
3	2	Bds. ggr. seröser Nasenausfluss
	4	Bds. mgr. seröser Nasenausfluss
4	1	Links mgr. seromuköser Nasenausfluss, rechter Mandibularlymphknoten mgr. vergrößert
	2	Links mgr. mukopurulenter Nasenausfluss, bds. Mandibularlymphknoten mgr. vergrößert
	3	Links ggr. seromuköser Nasenausfluss, nasaler Stridor (inspiratorisch > expiratorisch)
	4	Links mgr. muköser Nasenausfluss, rechts mgr. seröser Nasenausfluss, inspiratorisch nasaler Stridor
5	1	Zwei spontane Hustenstöße
	2	Spontaner produktiver Hustenstoß, bds. ggr. seröser Nasenausfluss
6	1	Bds. ggr. seröser Nasenausfluss, bds. ggr. druckdolente Mandibularlymphknoten

ANHANG

	2	Linker Mandibularlymphknoten ggr. vergrößert und druckdolent
7	1	Bds. ggr. vergrößerte Mandibularlymphknoten
	4	Bds. ggr. seröser Nasenausfluss
8	1	Rechts ggr. seröser Nasenausfluss, Herzrhythmus regelmäßig unregelmäßig
	2	Bds. ggr. seröser Nasenausfluss
	3	Herzrhythmus regelmäßig unregelmäßig, Lahmheit vorne rechts im Trab
	4	Bds. ggr. vergrößerte Mandibularlymphknoten
9	-	-
10	1	Bds. ggr. seröser Nasenausfluss
	3	Bds. ggr. seröser Nasenausfluss
	4	Bds. ggr. seröser Nasenausfluss, Kotwasser und breiiger Kotabsatz
11	2	Rechter Mandibularlymphknoten ggr. vergrößert und druckdolent
12	1	Bds. ggr. verschärfte Lungengeräusche bei Auskultation, bds. ggr. seromuköser Nasenausfluss
	2	Bds. ggr. bis mgr. verschärfte Lungengeräusche bei Auskultation
13	4	Herzrhythmus regelmäßig unregelmäßig
14	2	Bds. ggr. vergrößerte Mandibularlymphknoten
	3	Bds. ggr. vergrößerte Mandibularlymphknoten
	4	Rechts ggr. seröser, weißlicher Nasenausfluss
15	-	-
16	1	Bds. ggr. verschärfte Lungengeräusche bei Auskultation
	2	Rechts ggr. verschärfte Lungengeräusche bei Auskultation, bds. ggr. seröser Nasenausfluss
	3	Bds. ggr. verschärfte Lungengeräusche bei Auskultation
	4	Bds. mgr. verschärfte Lungengeräusche bei Auskultation, ein Hustenstoß auslösbar, Bauchatmung, geblähte Nüstern
17	1	Bds. mgr. vergrößerte Mandibularlymphknoten
	3	Bds. ggr. vergrößerte Mandibularlymphknoten
	4	Ggr. angelaufene distale Hintergliedmaßen
18	2	Rechts ggr. mukopurulenter Nasenausfluss, Kotwasser
	3	Bds. mgr. seröser Nasenausfluss, Herzrhythmus regelmäßig unregelmäßig
	4	Ggr. Lahmheit vorne rechts

ANHANG

8.3.4 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen des TRHs

Tab. 27: UAW-Scores (n = 18) nach 2 µg/kg TRH (Mittelwert ± Standardabweichung)

min	Kauen	Flehmen	Lippenlecken	Husten	Gähnen
1	1,83 ± 0,86	0,22 ± 0,55	0,44 ± 0,86	0,17 ± 0,38	0,06 ± 0,24
2	1,56 ± 0,62	0,06 ± 0,24	0,50 ± 0,71	0,11 ± 0,32	0,17 ± 0,38
3	1,17 ± 0,86	0 ± 0	0,28 ± 0,57	0,11 ± 0,32	0,28 ± 0,57
4	0,44 ± 0,70	0 ± 0	0,22 ± 0,43	0 ± 0	0,28 ± 0,75
5	0,06 ± 0,24	0 ± 0	0,06 ± 0,24	0 ± 0	0,06 ± 0,24
6	0,06 ± 0,24	0 ± 0	0,06 ± 0,24	0 ± 0	0 ± 0
7	0,44 ± 0,51	0 ± 0	0,11 ± 0,32	0 ± 0	0,11 ± 0,32
8	0,44 ± 0,62	0,06 ± 0,24	0,22 ± 0,43	0 ± 0	0 ± 0
9	0,39 ± 0,50	0 ± 0	0,17 ± 0,51	0 ± 0	0,11 ± 0,32
10	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
11	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
12	0,22 ± 0,43	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
13	0,22 ± 0,43	0 ± 0	0,17 ± 0,51	0 ± 0	0,06 ± 0,24
14	0,22 ± 0,43	0 ± 0	0,11 ± 0,32	0 ± 0	0,06 ± 0,24
15	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

min: Minute

Tab. 28: UAW-Scores (n = 18) nach 0,5 µg/kg TRH (Mittelwert ± Standardabweichung)

min	Kauen	Flehmen	Lippenlecken	Husten	Gähnen
1	1,72 ± 0,83	0,22 ± 0,43	0,28 ± 0,57	0,06 ± 0,24	0 ± 0
2	1,56 ± 0,51	0,11 ± 0,32	0,5 ± 0,79	0,06 ± 0,24	0,06 ± 0,24
3	0,83 ± 0,38	0 ± 0	0,39 ± 0,78	0 ± 0	0 ± 0
4	0,5 ± 0,62	0,06 ± 0,24	0,11 ± 0,32	0 ± 0	0,06 ± 0,24
5	0,11 ± 0,32	0 ± 0	0,17 ± 0,38	0 ± 0	0 ± 0
6	0,28 ± 0,46	0 ± 0	0,06 ± 0,24	0 ± 0	0 ± 0
7	0,33 ± 0,49	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
8	0,33 ± 0,59	0 ± 0	0,22 ± 0,55	0 ± 0	0 ± 0
9	0,28 ± 0,46	0 ± 0	0,06 ± 0,24	0 ± 0	0,11 ± 0,32
10	0,11 ± 0,32	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
11	0,11 ± 0,32	0 ± 0	0,06 ± 0,24	0 ± 0	0 ± 0
12	0,06 ± 0,24	0 ± 0	0,06 ± 0,24	0 ± 0	0 ± 0
13	0,33 ± 0,49	0 ± 0	0,11 ± 0,32	0 ± 0	0 ± 0
14	0,22 ± 0,55	0 ± 0	0,17 ± 0,51	0 ± 0	0,11 ± 0,32
15	0,06 ± 0,24	0,06 ± 0,24	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

min: Minute

9 LITERATURVERZEICHNIS

- Abbott CR, Rossi M, Kim M, AlAhmed SH, Taylor GM, Ghatei MA, Smith DM, Bloom SR (2000): Investigation of the melanocyte stimulating hormones on food intake. Lack of evidence to support a role for the melanocortin-3-receptor. *Brain Res* 869 (1-2): 203–210. DOI 10.1016/S0006-8993(00)02386-6.
- Ackermann H (2020): BiAS. für Windows. Handbuch Version 11.
- Adams AA, Siard-Altman MH, Reedy SE, Barker D, Elzinga S, Sanz MG, Urschel K, Ireland JL (2023): Evaluation of seasonal influences on adrenocorticotrophic hormone response to the thyrotropin-releasing hormone stimulation test and its accuracy for diagnosis of pituitary pars intermedia dysfunction. *Vet J* 300-302: 106035. DOI 10.1016/j.tvjl.2023.106035.
- Al-Najim W, Le Roux CW, Docherty NG (2018): Integrated insights into the role of alpha-melanocyte stimulatory hormone in the control of food intake and glycaemia. *Peptides* 100: 243–248. DOI 10.1016/j.peptides.2017.12.003.
- Andrews F, McFarlane D, Stokes A., Schott HC2, Bimes R., Marteniuk J, Hunt J., Toppin S., Kolb D., White G. (2011): An Evaluation of the Clinical Efficacy of Pergolide Mesylate Tablets for the Control of Clinical Signs Associated with Pituitary Pars Intermedia Dysfunction (Equine Cushing’s Disease) in Horses. Study Number: 6150-1353-09E-138. Corrected Freedom of Information Summary, New Animal Drug Application, NADA 141-331, Prascend Tablets, Pergolide Mesylate, Horse. <https://animaldrugsatfda.fda.gov/adafda/app/search/public/document/downloadFoi/890> (letzter Zugriff August 2024).
- Asplin KE, Sillence MN, Pollitt CC, McGowan CM (2007): Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies. *Vet J* 174 (3): 530–535. DOI 10.1016/j.tvjl.2007.07.003.
- Ayala I, Martos NF, Silvan G, Gutierrez-Panizo C, Clavel JG, Illera JC (2012): Cortisol, adrenocorticotrophic hormone, serotonin, adrenaline and noradrenaline serum concentrations in relation to disease and stress in the horse. *Res Vet Sci* 93 (1): 103–107. DOI 10.1016/j.rvsc.2011.05.013.
- Bailey CJ, Flatt PR (1987): Insulin releasing effects of adrenocorticotropin (ACTH 1-39) and ACTH fragments (1-24 and 18-39) in lean and genetically obese hyperglycaemic (ob/ob) mice. *Int J Obes* 11 (2): 175–181.
- Bamford NJ, Stewart AJ, El-Hage CM, Bertin FR, Bailey SR (2023): Investigation of breed differences in plasma adrenocorticotrophic hormone concentrations among healthy horses and ponies. *Vet J* 296-297: 105995. DOI 10.1016/j.tvjl.2023.105995.
- Banse HE, Whitehead AE, McFarlane D, Chelikani PK (2021): Markers of muscle atrophy and impact of treatment with pergolide in horses with pituitary pars intermedia dysfunction and muscle atrophy. *Domest Anim Endocrinol* 76: 106620. DOI 10.1016/j.domaniend.2021.106620.

ANHANG

- Baumgart A, Gerhards H (2014): Besonderheiten der Tigerschecken-Uveitis und möglicher Cyclosporin A Einsatz in deren Therapie in Deutschland. *Pferdeheilkunde* 30 (6): 626–632.
- Beech J (1994): Treatment of hypophysial adenomas. *The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian* 16 (7): 921–923.
- Beech J, Boston R, Lindborg S, Russell GE (2007): Adrenocorticotropin concentration following administration of thyrotropin-releasing hormone in healthy horses and those with pituitary pars intermedia dysfunction and pituitary gland hyperplasia. *J Am Vet Med Assoc* 231 (3): 417–426. DOI 10.2460/javma.231.3.417.
- Beech J, Boston RC, McFarlane D, Lindborg S (2009): Evaluation of plasma ACTH, alpha-melanocyte-stimulating hormone, and insulin concentrations during various photoperiods in clinically normal horses and ponies and those with pituitary pars intermedia dysfunction. *J Am Vet Med Assoc* 235 (6): 715–722. DOI 10.2460/javma.235.6.715.
- Beloff-Chain A, Morton J, Dunmore S, Taylor GW, Morris HR (1983): Evidence that the insulin secretagogue, beta-cell-tropin, is ACTH 22-39. *Nature* 301 (5897): 255–258. DOI 10.1038/301255a0.
- Bertin F-R, Fraser NS (2020): *Diseases of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis*. In: Bertin F-R, Fraser NS (Hrsg.), *Equine Endocrinology*. CAB International, 40–59.
- Brehm W, Gehlen H, Ohnesorge B, Wehrend A (Hrsg.) (2017): *Handbuch Pferdepraxis*. Enke Verlag, Stuttgart.
- Brzoska T, Luger TA, Maaser C, Abels C, Böhm M (2008): Alpha-melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, antiinflammatory and protective effects in vitro and in vivo, and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases. *Endocr Rev* 29 (5): 581–602. DOI 10.1210/er.2007-0027.
- Burns TA (2016): Effects of Common Equine Endocrine Diseases on Reproduction. *Vet Clin North Am Equine Pract* 32 (3): 435–449. DOI 10.1016/j.cveq.2016.07.005.
- Carmalt JL, Mortazavi S, McOnie RC, Allen AL, Unniappan S (2018): Profiles of pro-opiomelanocortin and encoded peptides, and their processing enzymes in equine pituitary pars intermedia dysfunction. *PLoS One* 13 (1): e0190796. DOI 10.1371/journal.pone.0190796.
- Carlslake H, Karikoski N, Pinchbeck G, McGowan C (2016): Serum insulin concentration in horses: Effect of storage and handling. *Vet J* 211: 94–96. DOI 10.1016/j.tvjl.2016.02.016.
- Catania A, Lipton JM (1993): alpha-melanocyte stimulating hormone in the modulation of host reactions. *Endocr Rev* 14 (5): 564–576. DOI 10.1210/edrv-14-5-564.
- Catania A, Lonati C, Sordi A, Carlin A, Leonardi P, Gatti S (2010): The melanocortin system in control of inflammation. *ScientificWorldJournal* 10: 1840–1853. DOI 10.1100/tsw.2010.173.

ANHANG

- Catania A, Rajora N, Capsoni F, Minonzio F, Star RA, Lipton JM (1996): The neuropeptide alpha-MSH has specific receptors on neutrophils and reduces chemotaxis in vitro. *Peptides* 17 (4): 675–679. DOI 10.1016/0196-9781(96)00037-x.
- Christen G, Gerber V, van der Kolk JH, Frey CF, Fouché N (2018): Fecal strongyle egg counts in horses with suspected pre-clinical pituitary pars intermedia dysfunction before and after treatment with pergolide. *Vet J* 235: 60–62. DOI 10.1016/j.tvjl.2018.03.007.
- Coenen M, Meyer H (2014): Energie-, Nährstoff- und Strukturstoffbedarf. Vitamine. Biotin. In: Meyer H, Coenen M, Vervuert I (Hrsg.), *Pferdefütterung*. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Enke, Stuttgart, 98.
- Copas VEN, Durham AE (2012): Circannual variation in plasma adrenocorticotrophic hormone concentrations in the UK in normal horses and ponies, and those with pituitary pars intermedia dysfunction. *Equine Vet J* 44 (4): 440–443. DOI 10.1111/j.2042-3306.2011.00444.x.
- Cordero M, Brorsen BW, McFarlane D (2012): Circadian and circannual rhythms of cortisol, ACTH, and α -melanocyte-stimulating hormone in healthy horses. *Domest Anim Endocrinol* 43 (4): 317–324. DOI 10.1016/j.domaniend.2012.05.005.
- Cordero M, Shrauner B, McFarlane D (2011): Bioactivity of plasma ACTH from horses with PPID compared to normal horses. *J Vet Intern Med* 25: 664.
- Cravana C, Medica P, Prestopino M, Fazio E, Ferlazzo A (2010): Effects of competitive and noncompetitive showjumping on total and free iodothyronines, β -endorphin, ACTH and cortisol levels of horses. *Equine Vet J Suppl* 42 (S 38): 179–184. DOI 10.1111/j.2042-3306.2010.00264.x.
- Danielson SR, Held JM, Schilling B, Oo M, Gibson BW, Andersen JK (2009): Preferentially increased nitration of alpha-synuclein at tyrosine-39 in a cellular oxidative model of Parkinson's disease. *Anal Chem* 81 (18): 7823–7828. DOI 10.1021/ac901176t.
- Deakin JF, Doströvsky JO, Smyth DG (1980): Influence of N-terminal acetylation and C-terminal proteolysis on the analgesic activity of beta-endorphin. *Biochem J* 189 (3): 501–506. DOI 10.1042/bj1890501.
- Delarocque J, Feige K, Carslake HB, Durham AE, Fey K, Warnken T (2023): Development of a Web App to Convert Blood Insulin Concentrations among Various Immunoassays Used in Horses. *Animals (Basel)* 13 (17). DOI 10.3390/ani13172704.
- Denis RGP, Joly-Amado A, Cansell C, Castel J, Martinez S, Delbes AS, Luquet S (2014): Central orchestration of peripheral nutrient partitioning and substrate utilization: implications for the metabolic syndrome. *Diabetes Metab* 40 (3): 191–197. DOI 10.1016/j.diabet.2013.11.002.
- Diez de Castro E, Lopez I, Cortes B, Pineda C, Garfia B, Aguilera-Tejero E (2014): Influence of feeding status, time of the day, and season on baseline adrenocorticotrophic hormone and the response to thyrotropin releasing hormone-stimulation test in healthy horses. *Domest Anim Endocrinol* 48: 77–83. DOI 10.1016/j.domaniend.2014.02.004.

ANHANG

- Dinparastisaleh R, Mirsaeidi M (2021): Antifibrotic and Anti-Inflammatory Actions of α -Melanocytic Hormone: New Roles for an Old Player. *Pharmaceuticals (Basel)* 14 (1): 45. DOI 10.3390/ph14010045.
- Donaldson MT, LaMonte BH, Morresey P, Smith G, Beech J (2002): Treatment with pergolide or cyproheptadine of pituitary pars intermedia dysfunction (equine Cushing's disease). *J Vet Intern Med* 16 (6): 742–746. DOI 10.1892/0891-6640(2002)016<0742:twpoco>2.3.co;2.
- Donaldson MT, McFarlane D, Jorgensen AJR, Beech J (2004): Correlation between plasma alpha-melanocyte-stimulating hormone concentration and body mass index in healthy horses. *American Journal of Veterinary Research* 65 (11): 1469–1473. DOI 10.2460/ajvr.2004.65.1469.
- Drozdowska K, Winter J, Barton AK, Merle R, Gehlen H (2023): Influence of feeding and other factors on adrenocorticotropin concentration and thyrotropin-releasing hormone stimulation test in horses and ponies. *Equine Vet J* 56 (2): 342–351. DOI 10.1111/evj.14030.
- Dunkel B, Jones SA, Pinilla MJ, Foote AK (2015): Serum bile acid concentrations, histopathological features, and short-, and long-term survival in horses with hepatic disease. *J Vet Intern Med* 29 (2): 644–650. DOI 10.1111/jvim.12551.
- Dunkel B, Wilford SA, Parkinson NJ, Ward C, Smith P, Grahame L, Brazil T, Schott HC (2014): Severe hypertriglyceridaemia in horses and ponies with endocrine disorders. *Equine Vet J* 46 (1): 118–122. DOI 10.1111/evj.12089.
- Durham AE (2016): Endocrine Disease in Aged Horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 32 (2): 301–315. DOI 10.1016/j.cveq.2016.04.007.
- Durham AE (2017): Therapeutics for Equine Endocrine Disorders. *Vet Clin North Am Equine Pract* 33 (1): 127–139. DOI 10.1016/j.cveq.2016.11.003.
- Durham AE (2022): The effect of pergolide mesylate on adrenocorticotrophic hormone responses to exogenous thyrotropin releasing hormone in horses. *Vet J* 285: 105831. DOI 10.1016/j.tvjl.2022.105831.
- Durham AE, Clarke BR, Potier JFN, Hammarstrand R, Malone GL (2021): Clinically and temporally specific diagnostic thresholds for plasma ACTH in the horse. *Equine Vet J* 53 (2): 250–260. DOI 10.1111/evj.13292.
- Durham AE, McGowan CM, Fey K, Tamzali Y, van der Kolk JH (2014): Pituitary pars intermedia dysfunction: Diagnosis and treatment. *Equine Veterinary Education* 26 (4): 216–223. DOI 10.1111/eve.12160.
- Durham AE, Newton JR, Smith KC, Hillyer MH, Hillyer LL, Smith MRW, Marr CM (2003): Retrospective analysis of historical, clinical, ultrasonographic, serum biochemical and haematological data in prognostic evaluation of equine liver disease. *Equine Vet J* 35 (6): 542–547. DOI 10.2746/042516403775467324.

ANHANG

- Durham AE, Potier JF, Huber L (2022): The effect of month and breed on plasma adrenocorticotrophic hormone concentrations in equids. *Vet J* 286: 105857. DOI 10.1016/j.tvjl.2022.105857.
- Eagle L, Morton J, Dunmore S (1993): Effect of dopamine on the secretion and processing of beta-cell tropin from isolated pituitary neurointermediate lobes of mice. *Ann N Y Acad Sci* 680: 499–501. DOI 10.1111/j.1749-6632.1993.tb19720.x.
- Fazio E, Medica P, Aronica V, Grasso L, Ferlazzo A (2008): Circulating beta-endorphin, adrenocorticotrophic hormone and cortisol levels of stallions before and after short road transport: stress effect of different distances. *Acta Vet Scand* 50 (1): 6. DOI 10.1186/1751-0147-50-6.
- Fazio E, Medica P, Cravana C, Ferlazzo AA (2016): Pituitary-adrenocortical adjustments to transport stress in horses with previous different handling and transport conditions. *Vet World* 9 (8): 856–861. DOI 10.14202/vetworld.2016.856-861.
- Fey K (2017): Störungen im hypothalamisch-hypophysären System. Hormonelle Diagnostik der PPID. Basaler ACTH-Wert. In: Brehm W, Gehlen H, Ohnesorge B, Wehrend A (Hrsg.), *Handbuch Pferdepraxis*. 4., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Enke Verlag, Stuttgart, 831–839.
- Fey K, Jonigkeit E, Moritz A (1998): Zum equinen Cushing-Syndrom (ECS). Fallbericht, Literaturobwertung zu Diagnostik und Therapie sowie wesentliche Unterschiede zum Cushing-Syndrome des Hundes. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 26 (1): 41–47.
- Fortin JS, Hetak AA, Duggan KE, Burglass CM, Penticoff HB, Schott HC (2021): Equine pituitary pars intermedia dysfunction: a spontaneous model of synucleinopathy. *Sci Rep* 11 (1): 16036. DOI 10.1038/s41598-021-95396-7.
- Fouché N, van der Kolk JH, Bruckmaier RM, Luz I, Foerster G, Gerber V (2015): Venipuncture does not affect adrenocorticotrophic hormone concentration in horses. *Vet Rec* 177 (9): 223. DOI 10.1136/vr.103274.
- Frank N, Bailey S, Bertin FR, Burns T, Laat M de, Durham A, Kritchevsky J, Menzies-Gow NJ (2022): Recommendations for the Diagnosis and Management of Equine Metabolic Syndrome (EMS). Revised June 2022. Prepared by the EMS Working Group. <https://sites.tufts.edu/equineendogroup/> (letzter Zugriff September 2024).
- Funk RA, Stewart AJ, Wooldridge AA, Kwessi E, Kempainen RJ, Behrend EN, Zhong Q, Johnson AK (2011): Seasonal changes in plasma adrenocorticotrophic hormone and α -melanocyte-stimulating hormone in response to thyrotropin-releasing hormone in normal, aged horses. *J Vet Intern Med* 25 (3): 579–585. DOI 10.1111/j.1939-1676.2011.0712.x.
- Gehlen H, Fisch J, Merle R, Trachsel DS (2021): Preliminary study on the effects of pergolide on left ventricular function in the horses with pituitary pars intermedia dysfunction. *J Vet Sci* 22 (5): e64. DOI 10.4142/jvs.2021.22.e64.

ANHANG

- Gehlen H, Jaburg N, Merle R, Winter J (2020): Can Endocrine Dysfunction Be Reliably Tested in Aged Horses That Are Experiencing Pain? *Animals (Basel)* 10 (8): 1426. DOI 10.3390/ani10081426.
- Gehring R, Beard L, Wright A, Coetzee J, Havel J, Apley M (2010): Single-dose oral pharmacokinetics of pergolide mesylate in healthy adult mares. *Vet Ther* 11 (1): E1-E8.
- Geyer H, Schulze J (1994): The long-term influence of biotin supplementation on hoof horn quality in horses. *Schweiz Arch Tierheilkd* 136 (4): 137–149. DOI 10.5169/seals-590989.
- Giasson BI, Duda JE, Murray IV, Chen Q, Souza JM, Hurtig HI, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ, Lee VM (2000): Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 290 (5493): 985–989. DOI 10.1126/science.290.5493.985.
- Glover CM, Miller LM, Dybdal NO, Lopez A, Duckett WM, McFarlane D (2009): Extrapituitary and Pituitary Pathological Findings in Horses with Pituitary Pars Intermedia Dysfunction: A Retrospective Study. *Journal of Equine Veterinary Science* 29 (3): 146–153. DOI 10.1016/j.jevs.2009.01.004.
- Goodale L, Frank N, Hermida P, D'Oench S (2015): Evaluation of a thyrotropin-releasing hormone solution stored at room temperature for pituitary pars intermedia dysfunction testing in horses. *American Journal of Veterinary Research* 76 (5): 437–444. DOI 10.2460/ajvr.76.5.437.
- Grandison L, Guidotti A (1977): Stimulation of food intake by muscimol and beta endorphin. *Neuropharmacology* 16 (7-8): 533–536. DOI 10.1016/0028-3908(77)90019-3.
- Hada T, Onaka T, Takahashi T, Hiraga A, Yagi K (2003): Effects of novelty stress on neuroendocrine activities and running performance in thoroughbred horses. *J Neuroendocrinol* 15 (7): 638–648. DOI 10.1046/j.1365-2826.2003.01042.x.
- Hart K, Bertin FR, Durham A, Frank N, McGowan C, Schott H, Stewart A (2023): Recommendations for the Diagnosis and Management of Pituitary Pars Intermedia Dysfunction (PPID). Revised October 2023. Prepared by the PPID Working Group. <http://sites.tufts.edu/equineendogroup> (letzter Zugriff September 2024).
- Hinney A, Schmidt A, Nottebom K, Heibült O, Becker I, Ziegler A, Gerber G, Sina M, Görg T, Mayer H, Siegfried W, Fichter M, Remschmidt H, Hebebrand J (1999): Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 84 (4): 1483–1486. DOI 10.1210/jcem.84.4.5728.
- Horn R, Bertin F-R (2019): Evaluation of combined testing to simultaneously diagnose pituitary pars intermedia dysfunction and insulin dysregulation in horses. *J Vet Intern Med* 33 (5): 2249–2256. DOI 10.1111/jvim.15617.
- Horn R, Stewart AJ, Jackson KV, Dryburgh EL, Medina-Torres CE, Bertin F-R (2021): Clinical implications of using adrenocorticotrophic hormone diagnostic cutoffs or

ANHANG

- reference intervals to diagnose pituitary pars intermedia dysfunction in mature horses. *J Vet Intern Med* 35 (1): 560–570. DOI 10.1111/jvim.16017.
- Hu K, Stewart AJ, Yuen KY, Hinrichsen S, Dryburgh EL, Bertin F-R (2020): The effect of freeze-thaw cycles on determination of immunoreactive plasma adrenocorticotrophic hormone concentrations in horses. *J Vet Intern Med* 34 (3): 1350–1356. DOI 10.1111/jvim.15771.
- Ichiyama T, Sato S, Okada K, Catania A, Lipton JM (2000): The neuroimmunomodulatory peptide alpha-MSH. *Ann N Y Acad Sci* 917: 221–226. DOI 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05386.x.
- Ireland JL, McGowan CM (2018): Epidemiology of pituitary pars intermedia dysfunction: A systematic literature review of clinical presentation, disease prevalence and risk factors. *Vet J* 235: 22–33. DOI 10.1016/j.tvjl.2018.03.002.
- Jančíková P, Horký P, Zeman L (2012): The Effect of Feed Additive Containing Vitamins and Trace Elements on the Elements Profile and Growth of Skin Derivatives in Horses. *Annals of Animal Science* 12 (3): 381–391. DOI 10.2478/v10220-012-0032-4.
- Jenks BG, Kuribara M, Kidane AH, Kramer BMR, Roubos EW, Scheenen WJMM (2012): The role of brain-derived neurotrophic factor in the regulation of cell growth and gene expression in melanotrope cells of *Xenopus laevis*. *Gen Comp Endocrinol* 177 (3): 315–321. DOI 10.1016/j.ygcen.2012.01.001.
- Kam YN, McKenzie K, Coyle M, Bertin F-R (2021): Repeatability of a thyrotropin-releasing hormone stimulation test for diagnosis of pituitary pars intermedia dysfunction in mature horses. *J Vet Intern Med* 35: 2885–2890. DOI 10.1111/jvim.16281.
- Kirkwood NC, Hughes KJ, Stewart AJ (2022a): Pituitary Pars Intermedia Dysfunction (PPID) in Horses. *Vet Sci* 9 (10): 556. DOI 10.3390/vetsci9100556.
- Kirkwood NC, Hughes KJ, Stewart AJ (2022b): Prospective Case Series of Clinical Signs and Adrenocorticotrophin (ACTH) Concentrations in Seven Horses Transitioning to Pituitary Pars Intermedia Dysfunction (PPID). *Vet Sci* 9 (10): 572. DOI 10.3390/vetsci9100572.
- Krude H, Schnabel D, Luck W, Grüters A (1999): Implications of the phenotype of POMC deficiency for the role of POMC-derived peptides in skin physiology. *Ann N Y Acad Sci* 885: 419–421. DOI 10.1111/j.1749-6632.1999.tb08702.x.
- Lincoln GA, Baker BI (1995): Seasonal and photoperiod-induced changes in the secretion of alpha-melanocyte-stimulating hormone in Soay sheep: temporal relationships with changes in beta-endorphin, prolactin, follicle-stimulating hormone, activity of the gonads and growth of wool and horns. *J Endocrinol* 144 (3): 471–481. DOI 10.1677/joe.0.1440471.
- Lincoln GA, Richardson M (1998): Photo-neuroendocrine control of seasonal cycles in body weight, pelage growth and reproduction: lessons from the HPD sheep model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 119 (3): 283–294. DOI 10.1016/S0742-8413(98)00017-6.

ANHANG

- Lipton JM, Catania A (1997): Anti-inflammatory actions of the neuroimmunomodulator alpha-MSH. *Immunol Today* 18 (3): 140–145. DOI 10.1016/s0167-5699(97)01009-8.
- Lothrop CD, Nolan HL (1986): Equine thyroid function assessment with the thyrotropin-releasing hormone response test. *American Journal of Veterinary Research* 47 (4): 942–944.
- Luger TA, Scholzen T, Grabbe S (1997): The role of alpha-melanocyte-stimulating hormone in cutaneous biology. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2 (1): 87–93. DOI 10.1038/jidsymp.1997.17.
- Manna SK, Sarkar A, Sreenivasan Y (2006): Alpha-melanocyte-stimulating hormone down-regulates CXC receptors through activation of neutrophil elastase. *Eur J Immunol* 36 (3): 754–769. DOI 10.1002/eji.200535209.
- McFarlane D (2007): Advantages and limitations of the equine disease, pituitary pars intermedia dysfunction as a model of spontaneous dopaminergic neurodegenerative disease. *Ageing research reviews* 6 (1): 54–63. DOI 10.1016/j.arr.2007.02.001.
- McFarlane D (2014): Pathophysiology and clinical features of pituitary pars intermedia dysfunction. *Equine Veterinary Education* 26 (11): 592–598. DOI 10.1111/eve.12237.
- McFarlane D (2019): Diagnostic Testing for Equine Endocrine Diseases: Confirmation Versus Confusion. *Vet Clin North Am Equine Pract* 35 (2): 327–338. DOI 10.1016/j.cveq.2019.03.005.
- McFarlane D, Banse H, Knych HK, Maxwell LK (2017): Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of pergolide mesylate following long-term administration to horses with pituitary pars intermedia dysfunction. *J Vet Pharmacol Ther* 40 (2): 158–164. DOI 10.1111/jvp.12339.
- McFarlane D, Beech J, Cribb A (2006): Alpha-melanocyte stimulating hormone release in response to thyrotropin releasing hormone in healthy horses, horses with pituitary pars intermedia dysfunction and equine pars intermedia explants. *Domest Anim Endocrinol* 30 (4): 276–288. DOI 10.1016/j.domaniend.2005.07.005.
- McFarlane D, Cribb AE (2005): Systemic and pituitary pars intermedia antioxidant capacity associated with pars intermedia oxidative stress and dysfunction in horses. *American Journal of Veterinary Research* 66 (12): 2065–2072. DOI 10.2460/ajvr.2005.66.2065.
- McFarlane D, Dybdal N, Donaldson MT, Miller L, Cribb AE (2005): Nitration and increased alpha-synuclein expression associated with dopaminergic neurodegeneration in equine pituitary pars intermedia dysfunction. *J Neuroendocrinol* 17 (2): 73–80. DOI 10.1111/j.1365-2826.2005.01277.x.
- McFarlane D, Hill K, Anton J (2015): Neutrophil function in healthy aged horses and horses with pituitary dysfunction. *Vet Immunol Immunopathol* 165 (3-4): 99–106. DOI 10.1016/j.vetimm.2015.04.006.

ANHANG

- McFarlane D, Holbrook TC (2008): Cytokine dysregulation in aged horses and horses with pituitary pars intermedia dysfunction. *J Vet Intern Med* 22 (2): 436–442. DOI 10.1111/j.1939-1676.2008.0076.x.
- McFarlane D, Paradis MR, Zimmel D, Sykes B, Brorsen BW, Sanchez A, Vainio K (2011): The effect of geographic location, breed, and pituitary dysfunction on seasonal adrenocorticotropin and α -melanocyte-stimulating hormone plasma concentrations in horses. *J Vet Intern Med* 25 (4): 872–881. DOI 10.1111/j.1939-1676.2011.0745.x.
- McGowan TW, Pinchbeck GP, McGowan CM (2012): Evaluation of basal plasma α -melanocyte-stimulating hormone and adrenocorticotrophic hormone concentrations for the diagnosis of pituitary pars intermedia dysfunction from a population of aged horses. *Equine Vet J* 45 (1): 66–73. DOI 10.1111/j.2042-3306.2012.00575.x.
- McGowan TW, Pinchbeck GP, McGowan CM (2013): Prevalence, risk factors and clinical signs predictive for equine pituitary pars intermedia dysfunction in aged horses. *Equine Vet J* 45 (1): 74–79. DOI 10.1111/j.2042-3306.2012.00578.x.
- Menzies-Gow NJ, Banse HE, Duff A, Hart N, Ireland JL, Knowles EJ, McFarlane D, Rendle D (2023): BEVA primary care clinical guidelines: Diagnosis and management of equine pituitary pars intermedia dysfunction. *Equine Vet J* 56 (2): 220–242. DOI 10.1111/evj.14009.
- Meyer H, Coenen M, Vervuert I (Hrsg.) (2014): *Pferdefütterung*. Enke, Stuttgart.
- Meyer JC, Hunyadi LM, Ordóñez-Mena JM (2022): The accuracy of ACTH as a biomarker for pituitary pars intermedia dysfunction in horses: A systematic review and meta-analysis. *Equine Vet J* 54 (3): 457–466. DOI 10.1111/evj.13500.
- Miller AB, Loynachan AT, Bush HM, Hart KA, Barker VD, Campana-Emard AG, Grubbs ST, Adams AA (2021): Effects of pituitary pars intermedia dysfunction and Prascend (pergolide tablets) treatment on endocrine and immune function in horses. *Domest Anim Endocrinol* 74: 106531. DOI 10.1016/j.domaniend.2020.106531.
- Miller MA, Pardo ID, Jackson LP, Moore GE, Sojka JE (2008): Correlation of pituitary histomorphometry with adrenocorticotrophic hormone response to domperidone administration in the diagnosis of equine pituitary pars intermedia dysfunction. *Vet Pathol* 45 (1): 26–38. DOI 10.1354/vp.45-1-26.
- Millington WR, Dybdal NO, Dawson R, Manzini C, Mueller GP (1988): Equine Cushing's disease: differential regulation of beta-endorphin processing in tumors of the intermediate pituitary. *Endocrinology* 123 (3): 1598–1604. DOI 10.1210/endo-123-3-1598.
- Morton JL, Davenport M, Beloff-Chain A, Bodkin NL, Hansen BC (1992): Correlation between plasma beta-cell tropin concentrations and body weight in obese rhesus monkeys. *Am J Physiol* 262 (6 Pt 1): E963-E967. DOI 10.1152/ajpendo.1992.262.6.E963.
- Murphy MT, Richards DB, Lipton JM (1983): Antipyretic potency of centrally administered alpha-melanocyte stimulating hormone. *Science* 221 (4606): 192–193. DOI 10.1126/science.6602381.

ANHANG

- Oktar BK, Yüksel M, Alican I (2004): The role of cyclooxygenase inhibition in the effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone on reactive oxygen species production by rat peritoneal neutrophils. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 71 (1): 1–5. DOI 10.1016/j.plefa.2003.11.009.
- Orth DN, Holscher MA, Wilson MG, Nicholson WE, Plue RE, Mount CD (1982): Equine Cushing's disease: plasma immunoreactive proopiomelanocortin peptide and cortisol levels basally and in response to diagnostic tests. *Endocrinology* 110 (4): 1430–1441. DOI 10.1210/endo-110-4-1430.
- Orth DN, Nicholson WE (1982): Bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin in normal equine pituitary and in pituitary tumors of horses with Cushing's disease. *Endocrinology* 111 (2): 559–563. DOI 10.1210/endo-111-2-559.
- Oury C, Maréchal P, Donis N, Hulin A, Hego A, Tridetti J, Nguyen M-L, Dulgheru R, Fillet M, Nchimi A, Lancellotti P (2020): Dexfenfluramine and Pergolide Cause Heart Valve Disease via Valve Metabolic Reprogramming and Ongoing Matrix Remodeling. *Int J Mol Sci* 21 (11): 4003. DOI 10.3390/ijms21114003.
- Pease AP, Schott HC, Howey EB, Patterson JS (2011): Computed tomographic findings in the pituitary gland and brain of horses with pituitary pars intermedia dysfunction. *J Vet Intern Med* 25 (5): 1144–1151. DOI 10.1111/j.1939-1676.2011.00784.x.
- Phillips JC, Lembcke LM (2013): Equine melanocytic tumors. *Vet Clin North Am Equine Pract* 29 (3): 673–687. DOI 10.1016/j.cveq.2013.08.008.
- Pichon S, Gehlen H (2017): Pituitary Pars Intermedia Dysfunction (PPID) – Is there a correlation between severity of clinical signs and plasma ACTH concentrations in horses? *PHK* 33 (6): 548–562. DOI 10.21836/PEM20170603.
- Pimenta J, Prada J, Cotovio M (2023): Equine Melanocytic Tumors: A Narrative Review. *Animals (Basel)* 13 (2): 247. DOI 10.3390/ani13020247.
- Pongratz MC, Graubner C, Wehrli Eser M (2010): Equine Cushing's Syndrome: Long-term effect of Pergolide therapy. *PHK* 26 (4): 598–603. DOI 10.21836/PEM20100416.
- Prutton JSW, Kass PH, Watson JL, Pusterla N (2015): Pre-analytical stability of adrenocorticotrophic hormone from healthy horses in whole blood, plasma and frozen plasma samples. *Vet J* 204 (1): 123–124. DOI 10.1016/j.tvjl.2015.02.010.
- Reilly JD, Cottrell DF, Martin RJ, Cuddeford DJ (1998): Effect of supplementary dietary biotin on hoof growth and hoof growth rate in ponies: a controlled trial. *Equine Vet J Suppl* 30 (S 26): 51–57. DOI 10.1111/j.2042-3306.1998.tb05122.x.
- Rendle DI, Doran G, Ireland J, Edwards S (2019): Pharmacokinetics and pharmacodynamics of pergolide mesylate after oral administration in horses with pituitary pars intermedia dysfunction. *Domest Anim Endocrinol* 68: 135–141. DOI 10.1016/j.domaniend.2019.01.008.
- Rendle DI, Litchfield E, Gough S, Cowling A, Hughes KJ (2015): The effects of sample handling and N-phenylmaleimide on concentration of adrenocorticotrophic hormone in equine plasma. *Equine Vet J* 47 (5): 587–591. DOI 10.1111/evj.12319.

ANHANG

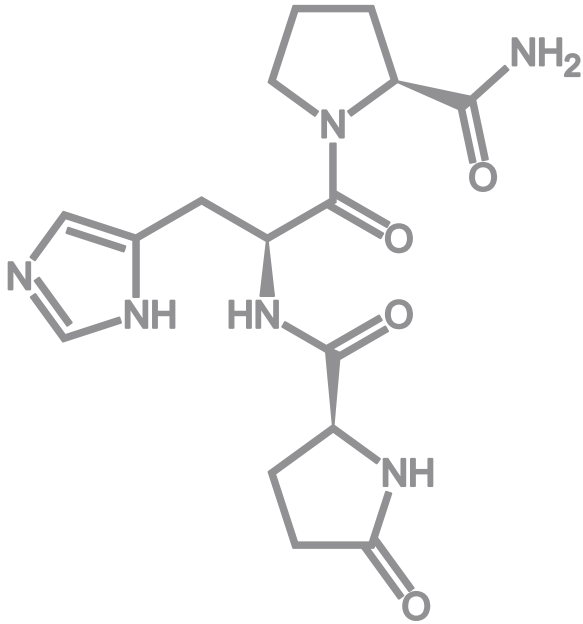
- Restifo MM, Frank N, Hermida P, Sanchez-Londoño A (2016): Effects of withholding feed on thyrotropin-releasing hormone stimulation test results and effects of combined testing on oral sugar test and thyrotropin-releasing hormone stimulation test results in horses. *American Journal of Veterinary Research* 77 (7): 738–748. DOI 10.2460/ajvr.77.7.738.
- Roth J, Zeisberger E, Vybíral S, Janský L (2004): Endogenous antipyretics: neuropeptides and glucocorticoids. *Front Biosci* 9: 816–826. DOI 10.2741/1277.
- Saland LC (2001): The mammalian pituitary intermediate lobe: an update on innervation and regulation. *Brain Res Bull* 54 (6): 587–593. DOI 10.1016/s0361-9230(01)00471-3.
- Schorn C (2019): TRH-Stimulationstests bei an PPID erkrankten Pferden und Ponys sowie kurz- und langfristige Effekte der Pergolidtherapie. 1. Auflage. VVB Lauferweiler Verlag, Giessen.
- Schott H, Andrews F, Durham A, Frank N, Hart K, Kritchevsky J, McFarlane D, Stewart A (2019): Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Pituitary Pars Intermedia Dysfunction. Revised June 2019. Prepared by the PPID Working Group. <https://sites.tufts.edu/equineendogroup/>.
- Schuhler S, Ebling FJP (2006): Role of melanocortin in the long-term regulation of energy balance: lessons from a seasonal model. *Peptides* 27 (2): 301–309. DOI 10.1016/j.peptides.2005.03.060.
- Schuhler S, Horan TL, Hastings MH, Mercer JG, Morgan PJ, Ebling FJ (2004): Feeding and behavioural effects of central administration of the melanocortin 3/4-R antagonist SHU9119 in obese and lean Siberian hamsters. *Behavioural Brain Research* 152 (2): 177–185. DOI 10.1016/S0166-4328(03)00260-2.
- Secombe CJ, Tan RHH, Perara DI, Byrne DP, Watts SP, Wearn JG (2017): The Effect of Geographic Location on Circannual Adrenocorticotrophic Hormone Plasma Concentrations in Horses in Australia. *J Vet Intern Med* 31 (5): 1533–1540. DOI 10.1111/jvim.14782.
- Shimizu H, Shargill NS, Bray GA, Yen TT, Gesellchen PD (1989): Effects of MSH on food intake, body weight and coat color of the yellow obese mouse. *Life Sciences* 45 (6): 543–552. DOI 10.1016/0024-3205(89)90105-7.
- Singh M, Mukhopadhyay K (2014): Alpha-melanocyte stimulating hormone: an emerging anti-inflammatory antimicrobial peptide. *Biomed Res Int* 2014: 874610. DOI 10.1155/2014/874610.
- Sinha PS, Schiöth HB, Tatro JB (2004): Roles of the melanocortin-4 receptor in antipyretic and hyperthermic actions of centrally administered alpha-MSH. *Brain Res* 1001 (1-2): 150–158. DOI 10.1016/j.brainres.2003.12.007.
- Sobrinho Crespo C, Perianes Cachero A, Puebla Jiménez L, Barrios V, Arilla Ferreiro E (2014): Peptides and food intake. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5: 58. DOI 10.3389/fendo.2014.00058.

ANHANG

- Stallenberger L (2020): TRH-Stimulationstest bei gesunden Pferden und Ponys. Gießen, Justus-Liebig-Universität, Dissertation.
- Steel NL, Ireland JL, McGowan CM (2022): Management of pituitary pars intermedia dysfunction in practice: A clinical audit. *Vet J* 289: 105899. DOI 10.1016/j.tvjl.2022.105899.
- Stewart AJ, Ireland JL, Durham AE, McGowan CM (2023): Diagnosis of equine pituitary pars intermedia dysfunction. *Vet J* 300-302: 106036. DOI 10.1016/j.tvjl.2023.106036.
- Tadori Y, Forbes RA, McQuade RD, Kikuchi T (2011): Functional potencies of dopamine agonists and antagonists at human dopamine D₂ and D₃ receptors. *Eur J Pharmacol* 666 (1-3): 43–52. DOI 10.1016/j.ejphar.2011.05.050.
- Tatum RC, McGowan CM, Ireland JL (2020): Efficacy of pergolide for the management of equine pituitary pars intermedia dysfunction: A systematic review. *Vet J* 266: 105562. DOI 10.1016/j.tvjl.2020.105562.
- Tatum RC, McGowan CM, Ireland JL (2021): Evaluation of the sensitivity and specificity of basal plasma adrenocorticotrophic hormone concentration for diagnosing pituitary pars intermedia dysfunction in horses: A systematic review. *Vet J* 275: 105695. DOI 10.1016/j.tvjl.2021.105695.
- Thane K, Uricchio C, Frank N (2022): Effect of early or late blood sampling on thyrotropin releasing hormone stimulation test results in horses. *J Vet Intern Med* 36 (2): 770–777. DOI 10.1111/jvim.16362.
- Thompson DL, Valencia NA, Walker NL, Oberhaus EL (2019): Melanocyte-Stimulating Hormone Response to Exercise, Twitching, Epinephrine Injection, Substance P Injection, and Prostaglandin-F₂α Administration in Mares. *Journal of Equine Veterinary Science* 77: 114–120. DOI 10.1016/j.jevs.2019.03.002.
- Tran T, Brophy JM, Suissa S, Renoux C (2015): Risks of Cardiac Valve Regurgitation and Heart Failure Associated with Ergot- and Non-Ergot-Derived Dopamine Agonist Use in Patients with Parkinson's Disease: A Systematic Review of Observational Studies. *CNS Drugs* 29 (12): 985–998. DOI 10.1007/s40263-015-0293-4.
- Trubacova R, Drastichova Z, Novotny J (2022): Biochemical and physiological insights into TRH receptor-mediated signaling. *Front Cell Dev Biol* 10: 981452. DOI 10.3389/fcell.2022.981452.
- Tsujii S, Bray GA (1989): Acetylation alters the feeding response to MSH and beta-endorphin. *Brain Res Bull* 23 (3): 165–169. DOI 10.1016/0361-9230(89)90142-1.
- Valencia NA, Thompson DL, Mitcham PB (2013): Changes in plasma melanocyte-stimulating hormone, ACTH, prolactin, GH, LH, FSH, and thyroid-stimulating hormone in response to injection of sulpiride, thyrotropin-releasing hormone, or vehicle in insulin-sensitive and -insensitive mares. *Domest Anim Endocrinol* 44 (4): 204–212. DOI 10.1016/j.domaniend.2013.03.001.
- Verburg-van Kemenade BM, Tappaz M, Paut L, Jenks BG (1986): GABAergic regulation of melanocyte-stimulating hormone secretion from the pars intermedia of *Xenopus*

ANHANG

- laevis: immunocytochemical and physiological evidence. *Endocrinology* 118 (1): 260–267. DOI 10.1210/endo-118-1-260.
- Vervuert I, Meyer H (2014): Fütterungsempfehlungen bei Krankheiten und Störungen. Störungen des Bewegungsapparates. Krankheiten des Hufes. In: Meyer H, Coenen M, Vervuert I (Hrsg.), *Pferdefütterung*. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Enke, Stuttgart, 257.
- Vorster DM, Wang W, Kemp KL, Bamford NJ, Bertin F-R (2023): Clinical implications of imprecise sampling time for 10- and 30-min thyrotropin-releasing hormone stimulation tests in horses. *Equine Vet J* 56 (2): 291–298. DOI 10.1111/evj.13991.
- Welsh CE, Duz M, Parkin TDH, Marshall JF (2016): Prevalence, survival analysis and multimorbidity of chronic diseases in the general veterinarian-attended horse population of the UK. *Prev Vet Med* 131: 137–145. DOI 10.1016/j.prevetmed.2016.07.011.
- Wetzel W, Wagner T, Vogel D, Demuth H, Balschun D (1997): Effects of the CLIP fragment ACTH 20–24 on the duration of REM sleep episodes. *Neuropeptides* 31 (1): 41–45. DOI 10.1016/S0143-4179(97)90018-4.
- Wintzer HJ (1986): Der Einfluss einer Vitamin-H-Substitution auf Wachstum und Beschaffenheit des Hufhorns. *Tierärztliche Praxis* 14 (4): 495–500.
- Wu Q, Chen J, Hua T, Cai J (2023): Alpha-melanocyte-stimulating hormone-mediated appetite regulation in the central nervous system. *Neuroendocrinology* 113 (9): 885–904. DOI 10.1159/000530804.
- Zak A, Siwinska N, Elzinga S, Barker VD, Stefaniak T, Schanbacher BJ, Place NJ, Niedzwiedz A, Adams AA (2020): Effects of advanced age and pituitary pars intermedia dysfunction on components of the acute phase reaction in horses. *Domest Anim Endocrinol* 72: 106476. DOI 10.1016/j.domaniend.2020.106476.
- Zhang Y, Scarpace PJ (2006): Circumventing central leptin resistance: lessons from central leptin and POMC gene delivery. *Peptides* 27 (2): 350–364. DOI 10.1016/j.peptides.2005.01.024.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978 3 8359 7228 5



Pferde-Zeichnung: © Martin @ stock.adobe.com
TRH-Formel: © JEGAS RA @ stock.adobe.com