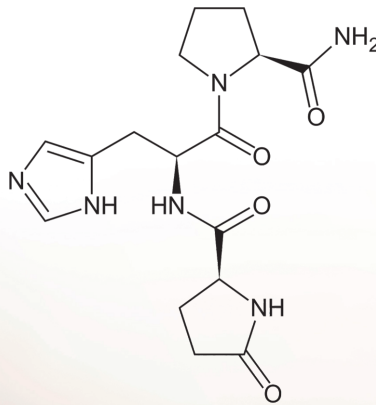


TRH-Stimulationstest bei gesunden Pferden und Ponys



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition 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 dem Autoren dieses Werkes.

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

1. Auflage 2020

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 Authors or the Publisher.

1st Edition 2020

© 2020 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 Lehrschiiede, Innere Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. Kerstin Fey

TRH-Stimulationstest bei gesunden Pferden und Ponys

INAUGURAL-DISSERTATION

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

eingereicht von

Lena Stallenberger

Tierärztin aus Berlin

Gießen 2020

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

1. Berichterstatter: Prof. Kerstin Fey

2. Berichterstatter: Prof. Gerhard Schuler

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juni 2020

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.

Lena Stallenberger

In folgenden Fachvorträgen wurden bereits Teile dieser Arbeit präsentiert:

Stallenberger L., Failing K., Fey K.:

ACTH-Sekretion bei gesunden Pferden nach Gabe von zwei TRH Dosierungen. 25. InnLab, 03.-04. Februar 2017, Göttingen.

Stallenberger L., Failing K., Fey K.:

ACTH responses after application of two TRH doses in healthy horses. Equine Endocrinology Summit, 04.-06. Januar 2017, Coral Gables/Florida.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	Die Hypophyse beim gesunden Pferd.....	3
2.1.1	Anatomie und Embryologie	3
2.1.2	Hypothalamus-Hypophysen-Achse	4
2.1.3	Physiologie der melanotropen und corticotropen Zellen im Vergleich.....	7
2.1.4	Zirkannuale Schwankungen der Hypophysenaktivität.....	9
2.1.5	Pathologie der Pars intermedia – Pituitary Pars Intermedia Dysfunction (PPID)	10
2.1.5.1	<i>Der TRH-Stimulationstest als Diagnostikum.....</i>	<i>12</i>
2.1.5.2	<i>TRH-Stimulationstest versus andere Tests zur PPID Diagnostik ...</i>	<i>13</i>
2.2	Die equine Schilddrüse	15
2.2.1	Anatomie und histologischer Aufbau.....	15
2.2.2	Synthese der Schilddrüsenhormone	16
2.2.3	Pathologien beim adulten Pferd	17
2.2.4	Diagnostische Tests.....	19
3	Eigene Untersuchungen	21
3.1	Material und Methoden	21
3.1.1	Studiendesign	21
3.1.2	Biometrische Planung	22
3.1.3	Tierversuchsgenehmigung.....	23
3.1.4	Studiendurchführung.....	23
3.1.4.1	Probandenauswahl.....	23
3.1.4.2	Einschlusskriterien	24
3.1.4.3	Ausschlusskriterien.....	24
3.1.4.4	Voruntersuchungen	24
3.1.4.5	Vorbereitung der Probanden	26
3.1.4.6	Durchführung der Stimulationstests	27
3.1.4.7	Erfassung klinischer Symptome nach TRH	29
3.1.4.8	Probenaufbereitung	30
3.1.4.9	Blutuntersuchungen	30
3.1.4.10	Analytik.....	31
3.1.4.10.1	Messung von ACTH und T4.....	32
3.1.4.10.2	Messung von Insulin und Cortisol	33
3.1.4.10.3	Glukosebestimmung	35
3.1.4.10.4	Messung von fT3 und fT4.....	35
3.1.5	Statistische Auswertung.....	38
3.2	Ergebnisse.....	40
3.2.1	Probandendaten	40
3.2.2	Ergebnisse der klinischen und labordiagnostischen Voruntersuchung ..	41
3.2.3	TRH-Dosierungen im statistischen Vergleich.....	43
3.2.4	NaCl-Kontrolltests	43
3.2.5	ACTH	48

Inhaltsverzeichnis

3.2.5.1	ACTH AUCs – Überblick	48
3.2.5.2	ACTH AUCs – individueller Vergleich	48
3.2.5.3	ACTH-Werte und -verläufe	50
3.2.5.4	Beurteilung der ACTH-Werte nach heutigen Cutoffs	58
3.2.6	Cortisol	60
3.2.6.1	Cortisol AUCs – Überblick	60
3.2.6.2	Cortisol AUCs – individueller Vergleich	60
3.2.6.3	Cortisolwerte und -verläufe	64
3.2.7	Insulin	65
3.2.7.1	Insulin AUCs Überblick	65
3.2.7.2	Insulin AUCs – Individueller Vergleich	65
3.2.7.3	Insulinwerte und -verläufe	66
3.2.8	Glukose	69
3.2.8.1	Glukose AUCs	69
3.2.8.2	Glukosewerte und -verläufe	70
3.2.9	Schilddrüsenhormone	70
3.2.9.1	Schilddrüsenhormone – Überblick über die AUCs	71
3.2.9.2	T4	72
3.2.9.2.1	T4 AUCs – individueller Vergleich	72
3.2.9.2.2	T4-Werte und -verläufe	73
3.2.9.3	ft4	74
3.2.9.3.1	ft4 AUC – individueller Vergleich	74
3.2.9.3.2	ft4-Werte und -verläufe	74
3.2.9.4	ft3	76
3.2.9.4.1	ft3 AUCs – individueller Vergleich	76
3.2.9.4.2	ft3-Werte und -Verläufe	77
3.2.9.5	Schilddrüsenhormone im zeitlichen Vergleich	78
3.2.10	Auftreten unerwünschter Symptome nach TRH	79
3.2.11	Einfluss der Fütterung auf die Hormone	80
3.2.11.1	Insulin und Glukose	81
3.2.11.2	Schilddrüsenhormone	83
3.2.12	Einfluss von BCS, Tageslichtlänge und Probandenalter auf die Hormonverläufe	86
4	Diskussion	90
4.1	Diskussion von Material und Methoden	90
4.1.1	Diskussion des Studiendesigns	90
4.1.2	Diskussion der Studiendurchführung	92
4.2	Diskussion der Ergebnisse	94
4.2.1	Diskussion der Probandenauswahl	94
4.2.2	Diskussion der NaCl-Kontrolltests	98
4.2.3	Diskussion der ACTH-Ergebnisse	100
4.2.4	Diskussion der Cortisol-Ergebnisse	106
4.2.5	Diskussion der Glukose- und Insulin-Ergebnisse	110
4.2.6	Diskussion der Schilddrüsenhormone	110
4.2.7	Diskussion unerwünschter Symptome nach TRH	117
4.2.8	Diskussion des Einflusses der Raufuttergabe	118
4.2.8.1	Einfluss der Heugabe auf ACTH-Werte	119
4.2.8.2	Einfluss der Heugabe auf Cortisol-Werte	120
4.2.8.3	Einfluss der Heugabe auf Glukose und Insulin	121

Inhaltsverzeichnis

4.2.8.4	<i>Einfluss der Heugabe auf die Schilddrüsenhormone</i>	125
4.2.9	Diskussion des Einflusses der Tageslichtlänge	126
4.2.10	Diskussion des Einflusses des Body Condition Scores (BCS).....	128
4.2.10.1	<i>Korrelation des BCS mit Insulin</i>	129
4.2.10.2	<i>Korrelation des BCS mit Cortisol</i>	130
5	Zusammenfassung	132
6	Summary	134
7	Literaturverzeichnis	136
8	Anhang	153
8.1	Kennzahlen der analytischen Tests	153
8.1.1	Immulite® 2000 ACTH	153
8.1.2	Immulite® 2000 Canine Total T4	155
8.1.3	ADVIA Centaur® Cortisol Assay	157
8.1.4	ADVIA Centaur® Insulin Assay.....	159
8.1.5	cobas® Elecsys FT3 III	160
8.1.6	cobas® Elecsys FT4 II	161
8.2	Tabellenverzeichnis	163
8.3	Abbildungsverzeichnis	164

Abkürzungsverzeichnis

α -MSH	alpha-Melanozyten stimulierendes Hormon
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
AE	Acridiniumester
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
AUC	Area under the Curve
AVP	Arginin-Vasopressin
BCS	Body Condition Score
CLIP	Corticotropin-like Intermediate Lobe Peptide
CLEIA	Chemilumineszenz-Enzymimmunometrischer Assay
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone
DIT	Diiodytyrosin
DST	Übernacht-Dexamethason-Suppressionstest
ft3	freies Triiodthyronin
ft4	freies Thyroxin
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GH	Growth Hormone
GHRH	Growth Hormone-Releasing Hormone
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormone
IF	Inhibitingfaktor
IU	Internationale Einheit
i.v.	intravenös
JLU	Justus-Liebig-Universität Gießen
KGW	Körpergewicht
KR	Kreuzreaktivität
LH	Luteinisierendes Hormon
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MIT	Monoiodtyrosin
MW	Arithmetischer Mittelwert

Abkürzungsverzeichnis

n.s.	nicht signifikant
PC1	Prohormonconvertase I
PC2	Prohormonconvertase II
PMP	Paramagnetische Partikel
POMC	Pro-Opiomelanocortin
PPID	Pituitary Pars Intermedia Dysfunction
PTU	Propylthiouracil
RF	Releasingfaktor
RLU	Relative Lichteinheiten
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
Sens.	Sensitivität
Spez.	Spezifität
SD	Standardabweichung
T3	Triiodthyronin
T4	Thyroxin
Tab.	Tabelle
TH	Tyrosin Hydroxylase
TRH	Thyreotropin-Releasing-Hormone
TSH	Thyreidea-stimulierendes Hormon
VK	Variationskoeffizient

1 Einleitung

Die Pituitary Pars Intermedia Dysfunction (PPID) ist eine bei älteren Equiden häufig vorkommende, meist langsam fortschreitende endokrinologische Erkrankung des Zwischenlappens der Hypophyse, die durch eine übermäßige Hormonausschüttung gekennzeichnet ist (McFarlane 2011). Klinisch tritt die PPID durch eine Vielzahl an Symptomen in Erscheinung, wobei das Auftreten einer Hufrehe die schwerwiegendste Komplikation darstellt, die die Euthanasie betroffener Tiere erforderlich machen kann (Schott 2002). Um solche Verläufe zu vermeiden ist eine frühzeitige Diagnosestellung mit folgender Therapie essentiell – die bislang genutzten diagnostischen Tests können frühe Krankheitsstadien aber nur schlecht erkennen (McFarlane 2019).

Obwohl der TRH-Stimulationstest bereits 2014 als Frühdiagnostikum für PPID vorgestellt wurde (Durham et al. 2014), liegen bislang nur sehr unzureichende Daten zum Einfluss von Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH) auf das endokrine System gesunder Pferde vor. Gleichwohl wird der TRH-Stimulationstest als diagnostisches Mittel der Wahl für frühe Stadien bzw. bei durch andere Tests unklar gebliebenem PPID-Status propagiert (Equine Endocrinology Group 2019). Bislang wird dieser Test gewöhnlich mit einer standardisierten Menge von 1 mg TRH pro Pferd durchgeführt, wobei die Wahl dieser Dosis nach Kenntnis der Autorin nicht durch Studien überprüft ist.

Um Auswirkungen des TRH auf das endokrine System gesunder Pferde vergleichbarer als bisher zu ermitteln, wurde das Releasinghormon in der vorliegenden Arbeit auf das individuelle Körpergewicht bezogen mit 2 µg/kg TRH dosiert, was den üblichen 1 mg TRH/Tier bei 500 kg Körpergewicht entspricht. Für die korrekte Interpretation des Tests ist es notwendig, durch das Stimulans die maximal mögliche Freisetzung des Zielhormons, im Falle der PPID Diagnostik des adrenocorticotropen Hormons (ACTH), zu erreichen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass bei gesunden Pferden eine Halbierung der TRH-Dosis zu einer geringeren ACTH Ausschüttung führt.

Neben dem ACTH als Hauptzielparameter wurden weitere labordiagnostische Nebenparameter untersucht. So wurde zur Überprüfung der biologischen Aktivität des ACTH an der Nebennierenrinde (McKeever 2011) das Cortisol erfasst. Insulin, welches durch Cortisol inhibiert wird und das überdies eine wesentliche Rolle in der Hufrehepathogenese spielt (Asplin et al. 2007) sollte ebenso wie die Glukosespiegel und die Schilddrüsenhormone T4, fT4 und fT3 quantitativ bestimmt werden, um zu prüfen ob die Konzentrationen dieser Parameter durch die verringerte TRH-Dosierung beeinflusst werden.

Das Hauptziel der Dissertation bestand darin zu ermitteln, ob sich eine Halbierung der TRH-Dosis auf 1 µg/kg TRH insbesondere auf die ACTH-Ausschüttung aus der Hypophyse auswirkt.

2 Literaturübersicht

2.1 Die Hypophyse beim gesunden Pferd

2.1.1 Anatomie und Embryologie

Die Hypophyse ist eine endokrine Drüse, die in der Fossa hypophysialis ventral am Diencephalon innerhalb der Sella turcica liegt (Schmidt et al. 2007, McFarlane 2011). Von Rathmanner et al. (2012) wird sie für erwachsene Pferde eines durchschnittlichen Körpergewichts von 556 kg mit einer mittleren Länge und Dicke von 39,4 bzw. 21,6 mm angegeben. Die Untersuchung von 70 niederländischen Warmblutpferden ergab ein mittleres ($\pm$ Standardabweichung) Gewicht der Hypophyse von $3,1 \pm 0,5$ g (van der Kolk 1998).

Phylogenetisch besteht das Organ aus zwei Anteilen – Adenohypophyse und Neurohypophyse, die in Anlehnung an die Anatomie beim Primaten auch als Hypophysenvorder- bzw. -hinterlappen bezeichnet werden (Schott 2002). Die Adenohypophyse wird weiterhin untergliedert in die Pars distalis, Pars tuberalis und die beim Pferd gut entwickelte Pars intermedia. Die Neurohypophyse, die beim Pferd von der Adenohypophyse umschlossen wird (Malven 1997), wird in das Infundibulum und die Pars nervosa unterteilt (Capen et al. 1989). Das Infundibulum bildet nach dorsal eine trichterförmige Verbindung zum Hypothalamus (McFarlane 2011). Das Diaphragma sellae, eine Falte der Dura mater, schafft dennoch eine Trennung zum Gehirn (McFarlane 2011). Da dieses beim Pferd jedoch schlecht entwickelt ist, ist eine Ausdehnung der Hypophyse nach dorsal möglich (Loeb et al. 1966).

Die Adenohypophyse hat ihren embryologischen Ursprung im oropharyngealen Ektoderm. Sie formt sich aus der Rathkeschen Tasche, bei der es sich um eine dorsale Ausbuchtung der embryonalen Mundbucht handelt. Im Verlauf der Entwicklung kommt es zur vollständigen Separation der Rathkeschen Tasche vom Stomodaeum, welches sich in der Folge zur primären Mundhöhle entwickelt. Die Anlage der Neurohypophyse, auch als Infundibulum bezeichnet, entsteht als Ausbuchtung des ventralen Diencephalon und ist somit neuroektodermalen Ursprungs (Schnorr et al. 2006).

Beide Primordien wachsen einander entgegen und treten miteinander in Kontakt. Dies bildet die Voraussetzung für die weitere Differenzierung der Anlage. Das Epithel, welches die Rathke-Tasche auskleidet und an das Primordium der Neurohypophyse angrenzt, bildet den Zwischenlappen (Pars intermedia) – der Rest formt die Pars distalis und Pars tuberalis der Adenohypophyse (Musumeci et al. 2015, Schmidt und Dahme 2007, Schnorr und Kressin 2006).

2.1.2 Hypothalamus-Hypophysen-Achse

Funktionell steht die Hypophyse in engem Zusammenhang mit dem Hypothalamus, der diese als übergeordnetes endokrines Zentrum über die Sekretion von inhibitorischen und stimulatorischen Faktoren steuert. Die funktionelle Beziehung wird als Hypothalamus-Hypophysenachse bezeichnet und ist von zentraler Bedeutung um lebenswichtige Funktionen wie Zell-, Organ- sowie die gesamte Körperhomöostase (Hart et al. 2009), Wachstum, Reproduktion oder kardiovaskuläre Funktionen zu steuern (Hurcombe 2011).

Unter der Neurohypophyse versteht man eine Ansammlung von Axonen und Nervenendigungen, die ihren Ursprung im Nucleus paraventricularis bzw. supraopticus des Hypothalamus nehmen (McFarlane 2011). Die im Hypothalamus produzierten Hormone Arginin-Vasopressin (AVP), auch antidiuretisches Hormon (ADH) genannt, und Oxytozin gelangen über unmyelinisierte Axone in die Nervenendigungen in der Neurohypophyse. Dort werden sie in sekretorischen Vesikeln (Herring-Körper) gespeichert und nach Bedarf freigesetzt (Alexander et al. 1996, Hurcombe 2011).

Die Pars distalis der Adenohypophyse besteht aus einer Population unterschiedlicher Zellen, die sich anhand ihrer histologischen Färbung in azidophile, chromophobe und basophile Zellen untergliedern lassen (Cotran et al. 1999). Eine immunhistochemische Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen die Hypophysenhormone erlaubt eine funktionelle Untergliederung der Zellen (Schott 2002). Die nachfolgende Tabelle (Tab. 1) gibt einen Überblick über die Zelltypen und die aus ihnen hauptsächlich hervorgehenden Hormone.

Tab. 1: Zellen und Hormone der Pars distalis der Adenohypophyse.

Histologische Färbung	Zelltyp	Hauptsächlich gebildetes Hormon
Azidophil	somatotrop	Somatotropin/Growth Hormone (GH)
	lactotrop	Prolaktin
Basophil	gonadotrop	Luteinisierendes Hormon (LH), Follikelstimulierendes Hormon (FSH)
	thyreotrop	Thyreoidea stimulierendes Hormon (TSH)
Chromophob	corticotrop	Adrenocorticotropes Hormon (ACTH)

Die Pars intermedia besteht lediglich aus einem Zelltyp (McFarlane 2011). Da dieser bei vielen Spezies für die Kontrolle der Hautpigmentierung verantwortlich ist, werden diese Zellen als melanotrop bezeichnet (Schott 2002).

Funktionell ist die Adenohypophyse über das hypophysäre Portalvenengeflecht mit dem Hypothalamus verbunden (Alexander et al. 1996). Vom Hypothalamus sezernierte Releasing- und Inhibitingfaktoren gelangen darüber schnell an ihren Bestimmungsort, wo sie zur Synthese, Speicherung oder Freisetzung der entsprechenden Zielhormone führen (McFarlane 2011).

Tab. 2 bietet eine Übersicht über die vom Hypothalamus freigesetzten Faktoren inklusive der durch sie angesprochenen Zielhormone der Hypophyse.

Tab. 2: *Releasingfaktoren (RF) und Inhibitingfaktoren (IF) des Hypothalamus mit den jeweiligen Zielhormonen der Adenohypophyse.*

Faktoren des Hypothalamus		Zielhormon Adenohypophyse
RF	Corticotropin-Releasing-Hormone (CRH)	ACTH
RF	Arginin-Vasopressin (AVP)	ACTH
RF	Growth-Hormone-Releasing-Hormone (GHRH)	Somatotropin
RF	Gonadotropin-Releasing-Hormone (GnRH)	FSH, LH
RF	Thyreotropin-Releasing-Hormone (TRH)	ACTH, TSH, Prolaktin, α -Melanozyten-stimulierendes Hormon (α -MSH)
IF	Somatostatin	Somatotropin
IF	Dopamin	Prolaktin, α -MSH

Wie aus Tab. 2 hervorgeht, ist das Thyreotropin-Releasing-Hormone (TRH) in der Lage Zielhormone aus mehreren Zelltypen freizusetzen. Neben der für das Hormon namensgebenden Stimulation zur Sekretion von TSH an den thyreotropen Zellen (van der Kolk et al. 2016) sind stimulatorische Effekte auch an den laktotropen, corticotropen und melanotropen Zellen zu beobachten. Dagegen zeigt es an den somatotropen Zellen hemmende Wirkung. Die gonadotrope Zellpopulation ist damit die einzige der Hypophysenzellen, die von TRH nicht angesprochen wird (Thompson et al. 2017).

TRH ist ein Tripeptidhormon, dass durch Proteasen aus einem Vorläufer-Polypeptid gespalten wird (Hurcombe 2011) – die TRH-produzierenden Neurone sind im lateralen Hypothalamus lokalisiert (Horjales-Arauo et al. 2014). Seine zellulären Wirkungen vermittelt TRH durch Interaktion mit zellmembranassoziierten G-Protein gekoppelten TRH-Rezeptoren (McFarlane et al. 2006). Es konnten zwei Rezeptortypen – TRH R1 und TRH R2 – identifiziert werden. Während TRH R1 bei Nagetieren sowohl in der Hypophyse als auch im zentralen Nervensystem lokalisiert werden konnte, kommt TRH R2 nur im

zentralen Nervensystem vor (O'Dowd et al. 2000, Gershengorn et al. 1996). Im Intermediärlappen der Hypophyse konnte bei der Ratte keine mRNA für TRH R2 nachgewiesen werden (O'Dowd et al. 2000). Nähere Untersuchungen zur TRH Wirkung an der equinen Hypophyse wurden von der amerikanischen Arbeitsgruppe um McFarlane (2006) durchgeführt. Mittels einer RT-PCR gelang den Autoren der Nachweis von mRNA für TRH R1 sowohl in der equinen Pars distalis wie auch der Pars intermedia. Aufgrund der Studienergebnisse von O'Dowd et al. (2000) hatten McFarlane et al. (2006) ausschließlich Primer für TRH R1 eingesetzt – das Vorkommen von TRH R2 in der Hypophyse des Pferdes wurde von ihnen nicht überprüft.

Zusätzlich führten die Autoren in vitro-Untersuchungen mit Zellkulturen beider Lokalisationen durch, die sie mit TRH inkubierten bzw. als Kontrollgruppe unbehandelt ließen und anschließend die Konzentrationen von ACTH und α -MSH im Überstand bestimmten. Entsprechend der physiologischerweise hauptsächlich gebildeten Hormone (Kapitel 2.1.3) zeigten die Zellen der Pars intermedia nach TRH-Inkubation einen 2,9-fachen Anstieg der α -MSH-Konzentration ($p < 0,05$) und die der Pars distalis einen 2,7-fachen Anstieg von ACTH. Die Arbeit von McFarlane et al. (2006) zeigt damit die Wirkung von TRH als physiologischen Releasingfaktor sowohl an der Pars distalis wie auch der Pars intermedia der equinen Hypophyse.

2.1.3 Physiologie der melanotropen und corticotropen Zellen im Vergleich

Die Stimulation der corticotropen Zellen in der Pars distalis der Adenohypophyse erfolgt über die Freisetzung der hypothalamischen Releasingfaktoren CRH (Corticotropin-Releasing-Hormone), AVP (Arginin-Vasopressin) und TRH (Hurcombe 2011).

Synthetisiert werden CRH und AVP im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus. In diesem Kerngebiet werden parvozelluläre (kleinzellige) und magnozellanuläre (großzellige) Neurone unterschieden. Während CRH, ein 41-Aminosäuren-Peptid in den parvozellulären Neuronen produziert wird, entstammt AVP, ein 9-Aminosäuren-Peptid den magnozellanulären Neuronen. CRH wird

weiterhin im Nucleus supraopticus synthetisiert. Über neurosekretorische Endungen werden beide Peptide unmittelbar in das hypophysäre Portalvenensystem abgegeben und erreichen so ihren Wirkungsort an der Adenohypophyse (Evans et al. 1996).

Die melanotropen Zellen der Pars intermedia werden durch aminerge Neuronen des Hypothalamus reguliert (Schott 2002). Dopamin ist dort der primäre Neurotransmitter, der inhibitorisch auf die melanotropen Zellen der Pars intermedia wirkt. Auf die stimulierende Wirkung von TRH auf die Pars intermedia wurde bereits eingegangen (Kapitel 2.1.2).

Die dopaminergen Neurone sind hauptsächlich im Nucleus arcuatus des Hypothalamus lokalisiert und projizieren von dort aus ins Portalvenensystem, worüber sie die Sekretion von Prolaktin, GH und TSH inhibieren (Hurcombe 2011). Darüber hinaus bilden sie direkte Synapsen mit den melanotropen Zellen der Pars intermedia (Saland 2001) und hemmen dadurch tonisch die Freisetzung ihrer Hormone (Orth et al. 1982, Malven 1997, Yamagushi et al. 1996). Die Verabreichung von Dopaminagonisten reduziert folglich die Sekretion von ACTH-Vorläufern aus der Pars intermedia (Munoz et al. 1996, Donaldson et al. 2002).

Sowohl in den corticotropen Zellen der Pars distalis als auch in den melanotropen Zellen der Pars intermedia wird Pro-Opiomelanocortin (POMC) synthetisiert (Raffin-Sanson et al. 2003). Es handelt sich dabei um ein Vorläuferpolypeptid aus 267 Aminosäuren, das gewebespezifisch umfassenden posttranslationalen enzymatischen Spaltungsprozessen unterzogen wird (Cawley et al. 2016).

Durch die Spaltung an acht potentiellen Spaltstellen mit folgender N-Acetylierung sowie carboxyterminaler Proteolyse entsteht eine Population von Peptiden unterschiedlicher Bioaktivität (Hurcombe 2011, Ham et al. 1984, Millington et al. 1992, Wilkinson 2006).

In der Pars distalis wird das POMC durch die Serinprotease Prohormonconvertase I (PC1) in Spaltprodukte bis zum ACTH und β -Lipotropin zerlegt (McFarlane 2011). Die Pars intermedia ist zusätzlich mit der Prohormonconvertase II (PC2) ausgestattet (Raffin-Sanson et al. 2003), was zur weiteren Aufspaltung der Peptide führt. Das vorübergehend auch dort gebildete

ACTH wird in den melanotropen Zellen vollständig aufgespalten in α -MSH und Corticotropin-like Intermediate Lobe Peptide (CLIP). Das β -Lipotropin wird ebenfalls weiter metabolisiert, sodass β -Endorphin entsteht (McFarlane 2011). Unter physiologischen Bedingungen stammt das im Körper beim Equiden verfügbare ACTH also aus der Pars distalis (Wilson et al. 1982).

Das ausgeschüttete ACTH wirkt an der Zona fasciculata der Nebennierenrinde (Hypophysen-Nebennierenachse) und reguliert die Hormonausschüttung über eine negative Rückkopplung durch Cortisol. Dessen inhibierender Effekt zeigt sich sowohl auf CRH und AVP des Hypothalamus, als auch direkt auf die corticotropen Zellen der Pars distalis (Schott 2002). Aufgrund des Fehlens von Glukokortikoidrezeptoren in der Pars intermedia (Dybdal et al. 1994) fehlt dieser inhibitorische Effekt dort (Malven 1997).

2.1.4 Zirkannuale Schwankungen der Hypophysenaktivität

Bei mehreren Spezies sind saisonale Unterschiede in der Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse bekannt (Cordero et al. 2012). Sie konnten beispielsweise für den Menschen (Walker et al. 1997), das Eichhörnchen (Boswell et al. 1994), am Rothirsch (Ingram et al. 1999), dem Schaf (Ssewanyana et al. 1990) und der Ziege (Alila-Johansson et al. 2003) festgestellt werden.

Beruhend auf diesen Beobachtungen untersuchten Donaldson et al. (2005) mögliche saisonale Einflüsse auch bei der Spezies Pferd. Dazu nahmen sie bei 29 Ponys und 10 Pferden jeweils vier Blutproben in festgelegten Monaten: die basale ACTH-Konzentration wurde im September in zwei aufeinanderfolgenden Jahren sowie im dazwischenliegenden Januar und Mai bestimmt. Das ACTH, der in Pennsylvania/USA untersuchten Tiere, zeigte in den beiden Messungen im September ähnliche Werte und lag statistisch signifikant höher ($p < 0,001$) als im Januar und Mai. Laut Kenntnis der Autorin zeigte die Arbeitsgruppe damit erstmals saisonale Rhythmen auch für das Pferd auf. In der Folge gab es zahlreiche weitere Untersuchungen, in denen zirkannuale Rhythmen sowohl für das basale ACTH als auch α -MSH gezeigt werden konnten. Die höchsten

Konzentrationen wurden dabei jeweils in den Herbstmonaten gemessen (Beech et al. 2009, McFarlane et al. 2011a, Copas et al. 2012, Funk et al. 2011, McGowan et al. 2013).

Die Ursache der saisonalen Schwankungen bzw. der daraus resultierende Nutzen ist im Einzelnen nicht geklärt und vermutlich tierartlich unterschiedlich. Für das Pferd wird diskutiert ob es sich um eine Anpassung hinsichtlich Änderungen in der Futterverfügbarkeit und des Energiebedarfs in den Herbst- und Wintermonaten handelt (Cordero et al. 2012).

2.1.5 Pathologie der Pars intermedia – Pituitary Pars Intermedia Dysfunction (PPID)

Die Pituitary Pars Intermedia Dysfunction ist eine der am häufigsten vorkommenden Erkrankungen bei Ponys und Pferden ab einem Alter von 15 Jahren (Brosnahan et al. 2003).

Aufgrund der unterschiedlichen Populationen, auf die in der Literatur Bezug genommen wird, schwanken die Angaben über die Prävalenz deutlich (James 2017). Von McGowan et al. (2013) wird sie für Tiere mit einem Mindestalter von 15 Jahren sogar mit 21 % angegeben, wobei die Arbeitsgruppe einen weiteren Anstieg mit zunehmendem Alter feststellen konnte.

Das Krankheitsbild als solches ist lange bekannt und wurde bereits 1982 von Orth et al. beschrieben. Die zugrundeliegende Pathogenese war dennoch lange unklar.

Betroffene Pferde fielen bei postmortalen Untersuchungen mit vergrößerten Hypophysen auf, die durch Hypertrophien, Hyperplasien und Adenome in der Pars intermedia bedingt waren (McFarlane 2005), sodass man ätiologisch lange Zeit eine primär neoplastische Veränderung annahm (van der Kolk 1995).

Heute geht man davon aus, dass es sich um eine progressive neurodegenerative Erkrankung handelt (McFarlane 2019, Cordero et al. 2012), die durch den Verlust der dopaminergen Hemmung von Melanotropen in der Pars intermedia gekennzeichnet ist (James 2017).

Erkenntnisse aus der Forschung im Nagetierbereich sowie die Arbeiten der amerikanischen Arbeitsgruppe um McFarlane (2005) waren wegweisend für die Aufklärung dieser Pathogenese. So konnte bei neonatalen Ratten eine Koinzidenz zwischen der Entwicklung der dopaminergen Innervation der Pars intermedia zur Abnahme der Proliferation von Melanotrophen gezeigt werden (Gary et al. 1992). An dopaminrezeptordefizienten Knockoutmäusen wurde die Entstehung einer Hypertrophie bzw. Hyperplasie der Pars intermedia beobachtet (Saiardi et al. 1998). Schließlich konnte McFarlane et al. (2005) auch am Pferd Ergebnisse sammeln, die die Rolle der Neurodegeneration in der Pathophysiologie der PPID belegen. Die Arbeitsgruppe nutzte dafür die Tyrosin-Hydroxylase (TH), ein Marker zum Nachweis dopaminergener Neurone und wies in Pars intermedia-Gewebe von 12 PPID-Pferden signifikant weniger TH als in der Kontrollgruppe nach (McFarlane et al. 2005).

Bedingt durch den Verlust der tonischen dopaminergen Hemmung (Kapitel 2.1.3) kommt es bei der PPID zur vermehrten Synthese von POMC und der Freisetzung der daraus abgeleiteten Peptide. Carmalt et al. (2018) konnten anhand der Hypophysen von 6 PPID-erkrankten Pferden eine Upregulation der mRNA für POMC, PC1 und PC2 gegenüber gesunden Kontrolltieren (n = 10) zeigen. Die abgeleiteten Peptide werden für die klinischen Symptome verantwortlich gemacht, wenngleich die dahinterstehende Pathogenese kaum geklärt ist (McFarlane 2011).

Die Symptome einer PPID-Erkrankung können vielfältig sein. Langes, teils gelocktes Fell und ein ausbleibender Fellwechsel sind wohl die charakteristischsten Symptome (Frank et al. 2006a). Weiterhin können die Pferde mit einer abnormen Fettverteilung, Muskelatrophie, Gewichtsverlust oder einer Immunsuppression auffallen (McFarlane 2011). Das Auftreten einer Hufrehe ist für die Patienten die wohl schwerwiegendste Komplikation einer PPID. Dadurch bedingte Schmerzen machen häufig eine Euthanasie erforderlich (Schott 2002). Die Prävalenz des Auftretens einer Hufrehe bei PPID-Patienten wird von verschiedenen Autoren mit 82 % (Hillyer et al. 1992), 24 % (van der Kolk et al. 1993), 59 % (Couetil et al. 1996) und 52 % (Schott et al. 2001) angegeben.

2.1.5.1 Der TRH-Stimulationstest als Diagnostikum

Nachdem McFarlane et al. (2006) das thyreotrope Releasinghormon (TRH) als physiologisches Stimulans sowohl an der Pars distalis als auch der Pars intermedia nachweisen konnten (Kapitel 2.1.2), folgten mehrere Untersuchungen, in denen die durch TRH freigesetzten ACTH-Konzentrationen von an PPID erkrankten Tieren mit jenen von gesunden Tieren verglichen wurden (McFarlane et al. 2006, Beech et al. 2007, Beech et al. 2011a und Beech et al. 2011b). Die Ergebnisse zeigten ausnahmslos, dass bei PPID-erkrankten Tieren infolge der Stimulation mehr ACTH und zum Teil weitere POMC-Spaltprodukte ausgeschüttet werden als von den Hypophysen gesunder Pferde.

Die beim Pferd erste Untersuchung mit ähnlicher Zielsetzung – dem Vergleich von Testresultaten gesunder und an PPID erkrankter Pferde infolge TRH-Stimulation – liegt deutlich länger zurück. Basierend auf Erkenntnissen aus der Humanmedizin über TRH-stimulierte Anstiege von Cortisol und ACTH bei Patienten mit Cushing-Syndrom (Krieger et al. 1977, Pieters et al. 1979) führten Beech und Garcia bereits 1985 erste Untersuchungen bei Pferden durch, in denen der TRH-Stimulationstest nicht mit dem Hauptziel der Überprüfung der Schilddrüsenfunktion eingesetzt wurde. In dieser Untersuchung wurde jedoch lediglich Cortisol und nicht das ACTH bestimmt.

Obwohl der TRH-Stimulationstest von Diez de Castro et al. (2014) und der Equine Endocrinology Group (2019) als Frühdiagnostikum für eine PPID propagiert wird, ist er nach Kenntnis der Autorin bislang durch publizierte Ergebnisse kaum validiert. Die von Beech et al. (2007) vorgeschlagenen Cut-Off-Werte zur Diagnostik einer PPID von 100 pg/ml ACTH 10 Minuten und 35 pg/ml ACTH 30 Minuten nach intravenöser Injektion von 1 mg TRH beruhen auf den Ergebnissen ihrer Arbeit, welche anhand von 48 Pferden gewonnen wurden. Durham et al. (2014) empfehlen mit 110 pg/ml nach 10 Minuten einen Wert, der geringfügig über jenem Wert von Beech et al. (2007) liegt.

In den publizierten Studien wird zur Durchführung des TRH-Stimulationstests bisher eine pro Pferd bzw. Pony festgelegte Menge TRH verabreicht. Abgesehen

von Lothrop et al. (1986), die für Ponys 0,5 mg TRH nutzen, wird gewöhnlich 1 mg TRH pro Tier zur Stimulation verwendet. Laut Kenntnis der Autorin fehlen bislang Untersuchungen zum Einfluss der TRH-Dosis auf die ACTH-Freisetzung. Diese TRH-Menge scheint somit nicht wissenschaftlich begründet zu sein sondern ist wohl rein empirisch gewählt.

2.1.5.2 TRH-Stimulationstest versus andere Tests zur PPID Diagnostik

Bei einer eindeutigen klinischen Ausprägung des Krankheitsbildes kann auf einen labordiagnostischen Test verzichtet werden, sodass die Diagnosestellung einer PPID in vielen Fällen aufgrund der Klinik erfolgt (Schott 2002). Während Perkins et al. (2002) den übermäßigen Haarwuchs, damals noch als Hirsutismus bezeichnet, als pathognomisch für die PPID-Erkrankung ansehen, definieren Couetil et al. (1996) die PPID über das Vorliegen mindestens eines weiteren klinischen Symptoms.

Zudem sind in der Literatur labordiagnostische Testverfahren beschrieben, von denen im Praxisalltag vor allem der Übernacht-Dexamethason-Suppressionstest (DST), sowie die Bestimmung der basalen ACTH-Konzentration Anwendung finden (Durham et al. 2014).

Basale ACTH-Konzentrationen liegen bei PPID-Pferden signifikant höher als bei hypophysengesunden Pferden (van der Kolk et al. 1995, Couetil et al. 1996, Donaldson et al. 2002, Perkins et al. 2002). Die Aussagekraft des DST beruht auf einer ausbleibenden Cortisol-suppression infolge exogener Glukokortikoidgabe bei Pferden mit einer PPID (Dybdal et al. 1994). Für beide Tests sind saisonale Unterschiede zu beachten (Donaldson et al. 2005). Während jahreszeitlich angepasste Referenzbereiche für die Befundung der basalen ACTH-Konzentration benötigt werden (Durham et al. 2014), sind beim DST falsch positive Ergebnisse im September möglich, sodass davon abgeraten wird, den Funktionstest im Herbst durchzuführen (McFarlane et al. 2004, Donaldson et al. 2005).

Laut Kenntnis der Autorin liegen keine Untersuchungen vor, die alle drei Tests hinsichtlich ihrer Sensitivität bzw. Spezifität vergleichen. Die Tab. 3 (nach Schorn

2019) gibt einen Überblick über Studien, in denen der TRH-Test mit anderen diagnostischen Tests verglichen wurde.

Tab. 3: Sensitivität (Sens.) und Spezifität (Spez.) des TRH-Stimulationstests (TRH-Stim.) im Vergleich zu anderen Tests zur PPID Diagnostik (nach Schorn 2019).

Autor	Jahr	Anzahl Pferde	Mess- größe	Verfahren	Sens. (%)	Spez. (%)
Frank et al.	2006 a	25 gesund	Cortisol	Kombinierter	88	76
		17 PPID		DST/TRH-Stim.		
			Cortisol	DST	65	76
			Cortisol	TRH-Stim.	41	92
Beech et al.	2007	10 gesund	Klinik	Fellwechsel- störung	95	71
		6 PPID	ACTH	Basales ACTH	71	100
				ACTH 30 Min nach TRH	100	89
Beech et al.	2011 a	19 gesund	ACTH	Basales ACTH	59	94
		13 PPID		ACTH 30 Min nach TRH	94	78
Beech et al.	2011 b	53 gesund	ACTH	ACTH 30 Min nach TRH	95	91
		35 PPID				

Schwierigkeiten im Vergleich der Resultate bestehen nach Ansicht der Autorin in den je nach Studie uneinheitlichen Definitionen von PPID. Während Frank et al. (2006a) PPID ausschließlich über das histologische Vorliegen von Mikro- bzw. Makroadenomen definierten, wurde von Beech et al. (2007) auch die Klinik berücksichtigt. Neben dem Nachweis von Hyperplasien in der Hypophyse mussten die Pferde in der frühen Publikation auch klinisch auffällig sein, um der PPID-Gruppe zugeordnet zu werden.

Hingegen erfolgte die Einteilung in den Untersuchungen von Beech et al. (2011a, 2011b) in erster Linie anhand der Klinik, histologische Untersuchungen konnten nur bei einigen Probanden durchgeführt werden. Die Resultate der

histologischen Untersuchung zeigten auf, dass Hyperplasien auch bei Probanden zu finden waren, die als Kontrollgruppe dienten.

2.2 Die equine Schilddrüse

Die Schilddrüse (Thyreoidea) ist eine der größten endokrinen Drüsen im Körper. In ihrer Funktion, der Synthese und Freigabe von Schilddrüsenhormonen, übernimmt sie unter anderem eine zentrale Rolle in der Steuerung des Grundumsatzes sowie der Regulation des Fett- und Kohlenhydratstoffwechsels (Barett et al. 2010). Weiterhin synthetisiert sie Calcitonin, welches eine entscheidende Funktion bei der Regulation der Calciumhomöostase des Körpers besitzt (Hernández-Castellano et al. 2020), und dem weiterhin eine Bedeutung im Glukosestoffwechsel und der Regulation von Nervenzellen zugeschrieben wird (González-Ramírez et al. 2017, Larsen et al. 2020).

2.2.1 Anatomie und histologischer Aufbau

Die Schilddrüse des Pferdes besteht aus zwei Lappen, die über einen schmalen, ventral der Trachea verlaufenden Isthmus verbunden sind (Sojka 1995). Die beiden Lobi liegen dorsal der dritten bis sechsten Trachealringe. Im physiologischen Zustand ist die Thyreoidea nur durch tiefe Palpation, jedoch nicht durch äußere Betrachtung ausfindig zu machen (Frank et al. 2002).

Histologisch ist die Drüse aus einer Vielzahl an Follikeln (Acini) aufgebaut. Diese sind mit einer einschichtigen Epithelzellschicht (Thyreozyten) ausgekleidet und enthalten ein proteinhaltiges Kolloid, das größtenteils aus dem Glykoprotein Thyreoglobulin besteht (Barett et al. 2010). Die Follikel werden von einem Netz aus Blutkapillaren umschlossen und untereinander durch feine Bindegewebsanteile zusammengehalten (Möstl 2005). Zudem enthält die Schilddrüse parafollikuläre Zellen (C-Zellen). Neben der Synthese von Calcitonin sezernieren diese Faktoren, welche helfen die Aktivität der Follikelzellen zu regulieren (Breuhaus 2011).

2.2.2 Synthese der Schilddrüsenhormone

Sowohl bei dem Schilddrüsenhormon Thyroxin (T4) als auch dem Triiodthyronin (T3) handelt es sich um Iod-enthaltende Aminosäuren, womit dieses Spurenelement einen essentiellen Rohstoff für die Hormonsynthese darstellt. Die Aufnahme erfolgt als Iodid durch die Thyreozyten, welche es zu einer reaktionsfreudigeren Verbindung oxidieren und diese anschließend in die zahlreichen Tyrosinreste des Thyreoglobulins einbauen. So entsteht Monoiodtyrosin (MIT) bzw. nach einer weiteren Iodierung Diiodtyrosin (DIT). Vermittelt wird dieser Schritt durch die Thyreoid-Peroxidase.

Unter Abspaltung von Alanin kondensieren zwei DIT-Moleküle oxidativ zu T4, während T3 aus der Kopplung von DIT und MIT hervorgeht. In dieser Form verbleiben beide Hormone als Reservoir im Kolloid, bis sie benötigt werden (Barett et al. 2010).

Nach Stimulation der Schilddrüse durch hypophysäres TSH, was seinerseits durch TRH des Hypothalamus reguliert wird (Breuhaus 2011), werden T3 und T4 in die Zirkulation abgegeben. Dazu wird Kolloid in die Thyreozyten aufgenommen, wo in Lysosomen die Peptidbindung von T3 bzw. T4 an das Thyreoglobulin hydrolytisch gespalten wird. Die freien Hormone gelangen ins Zytosol und werden von dort in die Kapillaren abgegeben (Barett et al. 2010).

Der Großteil der Schilddrüsenhormone wird im Plasma proteingebunden transportiert, insbesondere sind sie mit Thyroxin-bindendem Globulin, Thyroxin-bindendem Präalbumin und Albumin assoziiert. Beim Menschen sind es lediglich 0,03 % des T4 bzw. 0,3 % des T3, die ungebunden, also frei vorliegen und physiologisch aktiv sind (Morris et al. 1983). Die biologische Aktivität des freien T3 (fT3) liegt in etwa fünffach so hoch wie die von fT4 (Frank et al. 2002). Die Schilddrüse setzt deutlich mehr T4 als T3 frei. Ein Großteil des T3 entsteht erst in peripheren Geweben über Deiodination aus T4 (Breuhaus 2011).

2.2.3 Pathologien beim adulten Pferd

Laut Kenntnis der Autorin finden sich in der Literatur keine Untersuchungen, die die Inzidenz von Dysfunktionen der Schilddrüse in der Pferdepopulation beschreiben. Regelmäßig zu findende Veränderungen umfassen laut Literatur die Gruppe der Neoplasien sowie das Auftreten eines Hypothyreoidismus (Breuhaus 2011).

Hinsichtlich neoplastischer Veränderungen finden sich Veröffentlichungen über Adenome, Adenokarzinome, Karzinome wie auch C-Zell-Tumoren, wobei sich die meisten Schilddrüsentumore als benigne erweisen (Breuhaus 2011). Klinisch treten sie in der Regel lediglich über eine Vergrößerung der Schilddrüse in Erscheinung, während die Konzentrationen der Hormone unverändert sind (Messer et al. 2007). Nur Alberts et al. (2000) und Ramirez et al. (1998) beschreiben zwei Wallache (Quarter Horse und Halbaraber), bei denen tumoröse Veränderungen mit einem Hyperthyreoidismus einhergingen.

Der Hypothyreoidismus wird über eine mangelnde Schilddrüsenaktivität bzw. unzureichende Schilddrüsenhormonspiegel im Blut definiert, wobei die Existenz eines primären Hypothyreoidismus in der equinen Population kontrovers diskutiert wird (Lori et al. 2001).

Viele Erkenntnisse über das Krankheitsbild des Hypothyreoidismus wurden anhand von experimentellen Modellen gewonnen, bei denen dieser iatrogen erzeugt wurde (Frank et al. 2002). Breuhaus (2002) verabreichte dazu an 12 Pferde Propylthiouracil (PTU) in einer Dosierung von 4 mg/kg/d über sechs Wochen. PTU inhibiert die periphere Umwandlung von T4 zu T3 über Hemmung der 5'-Deiodinase. Bei längerer Verabreichung interferiert es weiterhin mit der Thyreoidperoxidase, inhibiert die Thyreoglobulin-Synthese sowie das Zellwachstum in den Schilddrüsenfollikeln. Wenngleich die labordiagnostischen Befunde des im Anschluss an die Medikation durchgeführten TRH-Stimulationstest inklusive TSH-Messung deutlich für das Vorliegen eines Hypothyreoidismus sprachen, konnten die Autoren keinerlei klinische Auffälligkeiten bei den Probanden beobachten (Breuhaus 2002).

Ein zweiter Weg zur experimentellen Erzeugung eines Hypothyreoidismus stellt die beidseitige chirurgische Thyreoidektomie dar. Mehrere Studien beim Pferd berichteten von Symptomen wie Kälteintoleranz, Lethargie, reduziertem Futterverbrauch, Ödemen der Hintergliedmaßen, Schwellungen der Augenlider, verminderte sexuelle Aktivität und einem stumpfen Haarkleid. Kälteintoleranz und Auffälligkeiten des Fells traten dabei am regelmäßigsten auf (Messer et al. 2007). Ein Vergleich dieser Symptome mit jenen aus Fallbeschreibungen, die Obesitas, Fettumverteilung sowie Hufrehe mit Hypothyreoidismus assoziierten, brachte keine Übereinstimmung. Daher gehen Frank et al. (2002) davon aus, dass der Hypothyreoidismus eine häufige Fehldiagnose, bedingt durch Messung der wenig spezifischen basalen Serumkonzentrationen der Schilddrüsenhormone ist.

Im Gegensatz zu primären sollen sekundäre Formen des Hypothyreoidismus häufiger vorkommen. Die niedrigen Hormonkonzentrationen können dabei Folge einer Suppression von TRH oder TSH sein – die Schilddrüsenfunktion selbst ist ungestört (Frank et al. 2002). Mögliche Ursachen sind beispielsweise längere Fastenzeiten, Sepsis, Stress bzw. Glukokortikoidgabe oder lokal produzierte Zytokine. Krankheiten oder Medikamente, welche die Konzentration an hormonbindenden Proteinen bzw. deren Affinität senken, kommen ebenfalls infrage (Breuhaus 2011). Ein Beispiel dafür stellt die Verabreichung von Phenylbutazon dar. Morris et al. (1983) verglichen bei 10 Pferden die T4- und T3-Konzentrationen vor und nach fünftägiger Behandlung mit Phenylbutazon (8 – 10 mg/kg i.v. 2x täglich). Sie stellten nach Medikation signifikant niedrigere T4- und T3-Konzentrationen im Vergleich zur initialen Untersuchung fest ($p < 0,01$ und $p = 0,05$). Ähnliche Erkenntnisse gewannen auch Sojka et al. (1993), die acht Pferde über einen Zeitraum von sieben Tagen zweimal täglich mit einer niedrigeren Dosis von 4,4 mg/kg Phenylbutazon intravenös behandelten.

2.2.4 Diagnostische Tests

Aufgrund der großen Beeinflussung der Schilddrüsenhormone durch „nonthyroidal factors“ (Kapitel 2.2.3) bieten Einzelmessungen von Schilddrüsenhormonen keine zuverlässige Aussage über die Funktionalität der Schilddrüse und können insbesondere das Vorliegen einer Hypothyreose nicht bestätigen (Breuhaus 2002). Eine höhere Aussagekraft hinsichtlich des Schilddrüsenstatus kann über die Durchführung von Stimulationstests gewonnen werden (Breuhaus 2002).

Als funktionelles diagnostisches Verfahren wurde beim Pferd zunächst der TSH-Stimulationstest untersucht, der auch beim Hund über das Ausbleiben eines T4-Anstiegs das Vorliegen eines primären Hypothyreoidismus anzeigen kann (Lorenz et al. 1980). Morris et al. (1983) untersuchten erstmals die Reaktion gesunder Pferde auf die Stimulation mit TSH. Sie bildeten 4 Gruppen aus je vier bis sechs Pferden und verabreichten mit 5 IU, 10 IU und 20 IU unterschiedliche TSH-Mengen, die verbliebene vierte Gruppe diente als Kontrolle. Mit Ausnahme der Kontrollgruppe stiegen die T4-Konzentrationen infolge der Stimulation im Mittel um das 2,0 – 2,7-fache der Basalwerte an. Maximalwerte wurden nach 6 – 12 Stunden erreicht, wobei sich zwischen den Gruppen mit den unterschiedlich hohen TSH-Dosierungen keine statistisch signifikanten Unterschiede ergaben. Die T3-Konzentrationen erreichten ihren Peak bereits nach 3 Stunden. Auch dieser war unabhängig von der verabreichten TSH-Dosis und befand sich 2,4 – 4,4-fach oberhalb der Basalwerte (Morris et al. 1983).

Da durch Verabreichung von TSH hypophysär nicht von hypothalamisch bedingten Hypothyreosen zu differenzieren sind, prüften Chen et al. (1986) die Hormonantwort bei gesunden Pferden nach Stimulation mit TRH. Aus ihren Ergebnissen schlossen sie, das Releasinghormon alternativ zu TSH für Schilddrüsenstimulationstests nutzen zu können. Harris et al. (1992) stimulierten eine Gruppe von 17 Pferden mit TRH und eine weitere mit TSH (n = 7). Die Antworten der Schilddrüsenhormone lagen für beide Tests in vergleichbaren Konzentrationen. T4-Maxima traten ebenfalls zeitlich ähnlich – etwa 4 Stunden nach Stimulation – auf.

Als Resultat mehrerer Untersuchungen gilt ein zweifacher Anstieg der T3 bzw. T4-Konzentration innerhalb von 2 bzw. 4 Stunden nach TRH-Injektion als „*generally accepted*“ für eine normale Schilddrüsenreaktion (Sommandahl et al. 2005). Pferde, die nach Überprüfung der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse mittels eines TRH-Stimulationstests unauffällige Anstiege der Schilddrüsenhormone zeigen, sollten nicht als hypothyreoid bezeichnet werden. Um bei dokumentierten Störungen zwischen hypophysär oder hypothalamisch bedingter Unterfunktion der Schilddrüse zu unterscheiden, ist die Messung von TSH erforderlich (Frank et al. 2002).

Zur Diagnose einer Hyperthyreose ist der T3-Suppressionstest beschrieben. Während gesunde Pferde nach intramuskulärer T3-Injektion mit erhöhten T3-Konzentrationen sowie der Suppression von T4 auffallen, bleibt diese inhibierende Reaktion bei hyperthyreoiden Tieren aus (Breuhaus 2011). Es finden sich zwei Fallbeschreibungen, in denen auf diesem Weg eine Hyperthyreose diagnostiziert wurde. Sowohl eine 19 jährige Quarter Horse Stute (Tan et al. 2008) als auch ein 23 jähriger Quarter Horse Wallach (Alberts et al. 2000) waren klinisch über eine Abmagerung aufgefallen.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methoden

Ziel der eigenen Untersuchungen war der Vergleich von zwei TRH Dosierungen (1,0 µg/kg und 2,0 µg/kg Körpergewicht) im Hinblick auf die ACTH-Ausschüttung als Hauptzielparameter bei gesunden Pferden.

3.1.1 Studiendesign

Die Untersuchung erfolgte in einer prospektiven, kontrollierten Studie im randomisierten Cross-over Design.

Für die aufgrund der vorangegangenen Abschätzung der notwendigen Probandenanzahl errechneten (Kapitel 3.1.2) elf eingeschlossenen Probanden umfasste die Studie die Voruntersuchungen (Kapitel 3.1.4.4) und zwei TRH-Stimulationstests. Um ggf. bestehende, circadiane Hormonschwankungen im Untersuchungszeitraum zu erfassen wurden vier Pferde zudem als Kontrolltiere genutzt. Anstelle von TRH wurde ihnen an einem weiteren Tag 0,9 %ige Natriumchloridlösung (NaCl) verabreicht.

Der Ablauf der Tests erfolgte stets nach dem gleichen Schema (Kapitel 3.1.4.6). Die Reihenfolge, in der die Dosierungen von 1,0 oder 2,0 µg/kg TRH pro Proband verabreicht wurde, war vor Studienbeginn randomisiert worden und kann der Tab. 4 entnommen werden. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die vorangegangene TRH-Applikation zu verhindern, lag zwischen den Testtagen jeweils eine Washout-Phase von mindestens 6 Tagen.

Die Wahl der Dosis von 2,0 µg/kg TRH basiert auf der Annahme eines durchschnittlich gebauten und ernährten Großpferdes mit 500 kg Körpergewicht. Die in bisherigen Untersuchungen üblicherweise eingesetzte Menge von 1 mg TRH pro Pferd ergibt dann umgerechnet pro Kilogramm Körpergewicht 2,0 µg. Diese Dosis wurde im Versuchsvorhaben halbiert, woraus die Gabe von 1,0 µg/kg TRH resultiert.

Tab. 4: Reihenfolge der randomisierten Verabreichung der beiden TRH-Dosierungen ($\mu\text{g/kg KGW}$) bei den 11 Probanden.

Pferd Nr.	Dosis 1. Testtag	Dosis 2. Testtag
1	1	2
2	1	2
3	2	1
4	2	1
5	1	2
6	2	1
7	1	2
8	2	1
9	2	1
10	2	1
11	1	2

Auch die Reihenfolge der Testabläufe bei den vier Kontrollpferden wurde mit Hilfe einer Randomisierungsliste festgelegt, wobei die NaCl-Kontrolle entweder vor oder im Anschluss an die TRH-Gaben erfolgte, nie zeitlich zwischen den beiden TRH-Tests. Bei zwei der vier Pferde wurde mit der NaCl-Kontrolle begonnen, bei den anderen beiden Pferden erfolgten zunächst die TRH-Stimulationstests. Auch bei der NaCl-Kontrolle wurde die Washout-Phase von mindestens 6 Tagen eingehalten.

3.1.2 Biometrische Planung

Im Vorfeld der Studie erfolgte eine biometrische Planung mit der Unterstützung von Herrn Dr. Klaus Failing, AG Biomathematik und Datenverarbeitung des Klinikums Veterinärmedizin an der JLU Gießen.

Basis dieser Planung bildeten die Daten aus der Publikation von Diez de Castro et al. (2014), aus denen entnommen werden konnte, dass die ACTH-Areas under the Curve (AUC) nach TRH-Gabe näherungsweise normal verteilt sind. Aus statistischen Gründen ist dann zu erwarten, dass auch die Differenz der AUC-

Werte näherungsweise normal verteilt ist. Die Standardabweichung dieser AUC-Differenzen war noch nicht bekannt. Für die Fallzahlabschätzung wurde der Quotient zwischen der kleinsten relevanten Differenz Δ und der unbekannten Standardabweichung σ zu Grunde gelegt. Ein Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ bei einseitiger Fragestellung, eine Power von $1 - \beta = 0,9$ sowie der kleinste medizinisch relevante relative Unterschied von einer Standardabweichung ($\Delta/\sigma = 1,0$) wurden als Annahmen für die Berechnung zugrunde gelegt.

Um diesen Unterschied unter den vorliegenden Annahmen nachzuweisen, ergab sich ein Stichprobenumfang von $n = 11$. Die Berechnungen erfolgten mithilfe des Programms BiAS für Windows (Ackermann, 2010).

3.1.3 Tierversuchsgenehmigung

Für die Durchführung der Studie wurde im Oktober 2015 ein Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchs beim Regierungspräsidium Gießen eingereicht. Das Versuchsvorhaben wurde darin für 15 Tiere beantragt, da die Möglichkeit bestand, Probanden nach den erforderlichen Voruntersuchungen vom Versuchsvorhaben ausschließen zu müssen bzw. während des Untersuchungszeitraumes zu verlieren. Der Antrag wurde am 04.11.2015 genehmigt (GI 18/13 Nr. 65/2015), sodass im November 2015 mit den ersten Untersuchungen begonnen wurde.

3.1.4 Studiendurchführung

3.1.4.1 Probandenauswahl

Die Rekrutierung der elf Pferde erfolgte auf persönliche Nachfrage seitens der Autorin bei den Tierbesitzern. Es konnten sowohl Pferde aus dem Besitz der JLU Gießen, als auch solche von privaten Besitzern genutzt werden. Alle Pferde mussten sich für mindestens 3 Monate vor Beginn der Untersuchungen für die Besitzer als gesundheitlich unauffällig gezeigt haben.

3.1.4.2 Einschlusskriterien

In die Studie eingeschlossen wurden gesunde Stuten und Wallache ab einem Alter von vier Jahren sowie mit einem Körpergewicht zwischen 300 und 750 kg. Hinsichtlich der Rasse gab es keine Einschränkungen, sodass Pferde und Ponys eingeschlossen werden konnten. Der Gesundheitszustand wurde maximal drei Wochen vor Durchführung des ersten Stimulationstests sowohl mit klinischen als auch labordiagnostischen Voruntersuchungen überprüft (Kapitel 3.1.4.4).

3.1.4.3 Ausschlusskriterien

Vom Versuchsvorhaben ausgeschlossen wurden Esel, Hengste sowie Equiden, bei denen klinisch oder labordiagnostisch Hinweise auf eine PPID bestanden oder chronische Erkrankungen bzw. schmerzhafte Prozesse anamnestisch oder während der Voruntersuchungen festgestellt wurden.

3.1.4.4 Voruntersuchungen

Maximal drei Wochen vor dem Testbeginn wurden bei allen Probanden Voruntersuchungen durchgeführt um den Gesundheitszustand tierärztlich zu überprüfen. Diese umfassten eine allgemeine klinische Untersuchung inklusive Prüfung auf Lahmheiten im Schritt, sowie labordiagnostische Parameter. Dafür erfolgte bei den Probanden zwischen 6 und 10 Uhr vor der Fütterung von Kraftfutter eine Blutentnahme aus der Vena jugularis externa mit einer Einmalkanüle (18 G, Becton Dickinson GmbH/Heidelberg). Es wurden 2 EDTA (EDTA K 2,7 ml), 1 Heparin (Li-Heparin 1,2 ml) und 1 Citrat-Röhrchen (Coagulation 9 NC 1,4 ml) befüllt, sowie eine Serumprobe (Serum 4,5 ml) gewonnen. Alle Blutprobenröhrchen sowie der für das Luer-Lock-System benötigte Adapter wurden von der Sarstedt AG und Co. KG/Nümbrecht bezogen. In den Proben wurden hämatologische und klinisch chemische Parameter bestimmt. Diese Routineanalytik erfolgte durch Mitarbeiter im Zentrallabor der Klinik für Kleintiere an der JLU Gießen.

In einer EDTA-Probe wurde zudem der initiale basale ACTH-Wert ermittelt, um eine subklinisch vorliegende PPID auszuschließen. Das basale ACTH musste

innerhalb des vom Untersuchungslabor Biocontrol (Bioscientia, Institut für medizinische Diagnostik GmbH, Ingelheim) für den jeweiligen Monat festgesetzten Referenzbereich liegen (Tab. 5). Die Referenzbereiche wurden laborintern anhand der Daten von 69 Pferden und Ponys erhoben, wobei der Immulite® verwendet wurde. Laut Herstellerangaben gibt es einen starken linearen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen des Immulite® und jenen des Immulite® 2000 ($r = 0,988$).

Für die vom Labor nicht aufgeführten Monate Februar, Mai und November wurde von der Autorin ein oberer Grenzwert von 30 pg/ml festgelegt. Dieser liegt unterhalb der Maxima, die für die anderen Monate angegeben sind, sodass falsch negative Werte im Hinblick auf eine PPID als unwahrscheinlich angesehen wurden.

Tab. 5: Laborinterne ACTH-Referenzbereiche von Biocontrol (pg/ml) für den Einschluss in die Studie.

Monate	Referenzbereich
März – April	8 – 35
Juni – August	2 – 40
September – Oktober	10 – 55
Dezember – Januar	4 – 33

Pferde mit einem Alter von ≥ 15 Jahren wurden weiterhin einem Dexamethason-Suppressions-Test (DST) unterzogen. Nach einer basal entnommenen Serumprobe zwischen 16 und 18 Uhr wurden 40 $\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht Dexamethason (Dexamethason-Injektionslösung ad us. vet. 2 mg/ml, cp-pharma/Burgdorf) intramuskulär verabreicht. Der 18 – 20 Stunden nach der Dexamethasoninjektion gemessene Cortisolspiegel im Serum musste mit einem Wert von $< 1 \mu\text{g/dl}$ ($\triangleq < 27,6 \text{ nmol/l}$) eine physiologische Suppression aufweisen, damit die Pferde an der Untersuchung teilnehmen konnten.

3.1.4.5 Vorbereitung der Probanden

Sofern möglich wurden die Tests in den Stallungen auf dem Campus für Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität in Gießen durchgeführt. Um stressbedingte Einflüsse auf die Testergebnisse zu minimieren, wurden die Pferde einen Tag vor dem jeweiligen Testtag, im Weiteren als Vortag bezeichnet, spätestens am frühen Nachmittag eingestallt und zunächst wie gewohnt gefüttert und gehalten. Die Pferde hatten so ausreichend Zeit um sich zu akklimatisieren, bevor mit der eigentlichen Untersuchung begonnen wurde. Probanden, bei denen das Verbringen in die Klinikgebäude aus unterschiedlichen Gründen nicht möglich war, verblieben im Heimatstall und die Untersuchungen wurden dort durchgeführt.

Ebenfalls am Vortag wurden alle Probanden erneut allgemein klinisch untersucht sowie auf Lahmheiten im Schritt geprüft, um höhergradige schmerzhafte Prozesse des Bewegungsapparates auszuschließen. Anschließend erfolgte die Gewichtsbestimmung der Tiere als Grundlage für die gewichtsbezogene Dosierung des TRH. Für Probanden, die sich für den Test in den Räumlichkeiten der JLU befanden, stand dafür die Tierwaage Tru-Test Ezi Weigh 2 mit einer Messgenauigkeit von $\pm 0,5$ kg zur Verfügung.

Im Fall der Testung von Privatpferden im Heimatstall, bei der aus logistischen Gründen keine Waage zur Verfügung stand, erfolgte die Bestimmung des Körpergewichts mittels des Spiller Pferdemaßbandes. Zur Durchführung wird dieses hinter dem Widerrist im Bereich der Gurtlage leicht straff angelegt. Ein Körpergewicht in Kilogramm kann dann direkt abgelesen werden, da das Maßband entsprechend skaliert ist. Untersuchungen in der Vergangenheit zeigten, dass die Körpergewichte, die auf diesem Weg ermittelt werden mit Bestimmungen auf einer Waage bei Großpferden gut übereinstimmen (Ellis et al. 1998).

Weiterhin wurde der Body Condition Score (BCS) der Probanden nach dem System von Henneke (Henneke et al. 1983) erfasst. Das Pferd wird dabei an sechs Lokalisationen (Hals, Widerrist, Schulter, Rippen, Lendenbereich, Schweifansatz) mit Scorepunkten von jeweils 1 – 9 bewertet, die anschließend zu einem Gesamtscore addiert und durch sechs dividiert werden. Die 1 steht

dabei für ein extrem stark abgemagertes Tier, während 9 Scorepunkte für ein maximal adipöses Pferd vergeben werden.

Da die Probanden am Morgen des Testtags nüchtern sein mussten, wurde ihnen am Vortag ab 22 Uhr das Futter entzogen. Bis zum Testbeginn entstand so eine Nüchternzeit von 8 – 10 Stunden. Die Pferde hatten jederzeit Zugang zu frischem Wasser.

3.1.4.6 Durchführung der Stimulationstests

Der Versuchsablauf erfolgte an jedem Testtag nach dem gleichen Prinzip.

Gemäß den Leitfäden zu häufigen tierärztlichen Tätigkeiten in der Pferdepraxis ([http://www.dvg.net/fileadmin/Bilder/DVG/PDF/Leitlinien/13-01-](http://www.dvg.net/fileadmin/Bilder/DVG/PDF/Leitlinien/13-01-Auswahl_an_Leitfaeden-Pferd_-_2013-1.pdf)

[Auswahl_an_Leitfaeden-Pferd_-_2013-1.pdf](http://www.dvg.net/fileadmin/Bilder/DVG/PDF/Leitlinien/13-01-Auswahl_an_Leitfaeden-Pferd_-_2013-1.pdf), letzter Zugriff: Februar 2020)

wurde den Probanden zwischen 6 und 8 Uhr ein Venenverweilkatheter (Venenverweilkatheter AD 2,4mm, 80mm Länge, Walter Veterinär-Instrumente e.K./Baruth) in eine Vena jugularis externa gelegt. Daran wurde eine kurze Verlängerung inklusive Dreiwegehahn (Discofix-3, Ø 1,2 x 2,2 mm, Länge: 10 cm; Braun/Melsungen) befestigt, um die folgenden Blutentnahmen zu erleichtern und möglichst schmerz- und stressfrei zu gestalten. Zu jedem Entnahmezeitpunkt wurden jeweils zwei Serumröhrchen (S-Monovette 9 ml) und 2 EDTA-Röhrchen (EDTA K 2,7 ml) mithilfe eines Multiadapters über das Aspirationsprinzip entnommen. Es wurden hier ebenfalls Blutprobenröhrchen der Firma Sarstedt/Nümbrecht verwendet. Um eine Verfälschung der Probe durch im Venenverweilkatheter zurückgebliebene Reste zu vermeiden, wurden vor der Entnahme jeweils 6 ml Blut mit einer Spritze aspiriert und verworfen. Unmittelbar im Anschluss an die Probenentnahme wurde der Venenverweilkatheter zur Gewährleistung der weiteren Durchgängigkeit mit 10 ml heparinisierter Natriumchloridlösung (50 I.E. Heparin/ml 0,9 %iger steriler NaCl-Lösung, Braun/Melsungen) gespült.

Zu Testbeginn waren die Probanden nüchtern, sodass unmittelbar nach Legen des Venenverweilkatheters die Nüchternprobe (-120 min) entnommen wurde. Um einen Einfluss einer Raufuttergabe auf die Parameter prüfen zu können, wurden die Pferde im Anschluss mit Heu gefüttert. Sie erhielten dabei 1/5 der

gewöhnlichen Raufutterration, die basierend auf aktuellen Empfehlungen mit 1,7 kg Heu pro 100 kg Körpermasse und pro Tag berechnet wurde. Um während des Versuchsvorhabens zu lange Nüchternzeiten und damit einhergehenden Stress zu vermeiden erhielten die Probanden 6 Stunden nach der ersten Fütterung erneut die gleiche Menge Heu. Raufutterreste, die zwei Stunden nach Futtergabe noch nicht aufgenommen waren, wurden aus der Box entfernt.

Zwei Stunden nach der ersten Fütterung wurden die Blutprobenentnahmen mit der Entnahme der Basalprobe (Zeitpunkt 0) fortgesetzt. Unmittelbar im Anschluss erfolgte die Placebogabe (0,9 % NaCl) bzw. TRH-Stimulation. Es wurde die Injektionslösung TRH Ferring 0,2 mg (Ferring Arzneimittel GmbH, Kiel) verwendet. Dabei handelt es sich um ein in der Humanmedizin als Diagnostikum zugelassenes Fertigprodukt. In randomisierter Reihenfolge (Tab. 4) wurden entweder zuerst 1,0 µg/kg oder 2,0 µg/kg TRH i.v. verabreicht, wobei immer das gleiche Injektionsvolumen von 10 ml verwendet wurde. Dieses wurde durch Zugabe des dafür notwendigen Volumens an isotoner Natriumchloridlösung zum TRH erhalten.

Die zehn weiteren Probenentnahmen zu den Zeitpunkten 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 240, 300 und 360 Minuten nach TRH-Injektion erfolgten wie zuvor beschrieben. Nach Entnahme der letzten Blutprobe wurde der Venenverweilkatheter entfernt und die Pferde wurden wie gewohnt gefüttert. Es folgte eine abschließende klinische Untersuchung. Probanden, die für die Studienteilnahme in die Räumlichkeiten der JLU verbracht worden waren, konnten wieder in den Heimatstall transportiert werden.

Um zu vermeiden, dass die Messergebnisse durch die zuvor verabreichte TRH-Dosis beeinflusst wurden, lag zwischen den jeweiligen Testtagen eines Probanden eine Washout-Phase von mindestens 6 Tagen. Diese wurde ebenfalls bei den NaCl-Kontrollen eingehalten. Die Gesamtversuchsdauer lag für jeden Probanden bei maximal sechs Wochen. Innerhalb dieser Zeit mussten die Voruntersuchungen, die Stimulationstests und die NaCl-Kontrollen abgeschlossen sein.

An jedem Testtag wurde zudem die Tageslichtlänge in Minuten dokumentiert, die im Internet unter www.sunrisesunset.de (letzter Zugriff: Februar 2020) recherchiert wurde.

3.1.4.7 Erfassung klinischer Symptome nach TRH

Im Zusammenhang mit der Durchführung des TRH-Stimulationstests ist das Auftreten von Symptomen beschrieben, die innerhalb der ersten fünf Minuten nach TRH-Injektion wieder abklingen sollen (Diez de Castro et al. 2014).

Um solche während des Testverlaufs auftretenden Symptome zu erfassen, standen die Pferde unmittelbar nach der TRH-Injektion für die nächsten 15 Minuten unter ständiger Beobachtung. Für die Symptome Kauen, Flehmen, Lippenlecken und Husten wurde jeweils ein Score notiert, der sich nach der Dauer des jeweilig aufgetretenen Symptoms richtete (Tab. 6). Bezugszeitraum für die Beurteilung waren jeweils die ersten sieben Minuten nach TRH-Injektion, die unterteilt in einzelne Minutenintervalle bewertet wurden. Die Einzelscores für die jeweiligen Minuten und Symptome wurden anschließend addiert, um einen Gesamtscore für den jeweiligen Testtag pro Proband zu erhalten. Zusätzliche, beziehungsweise später auftretende Symptome wurden notiert, wie in Tab. 6 angegeben bewertet und gingen ebenfalls in den Gesamtscore ein.

Tab. 6: *Scoring-System zur Erfassung der Symptome in den ersten 15 Minuten nach TRH-Injektion.*

Score		Dauer des Auftretens im Bezugsintervall von jeweils 1 Minute
0	Symptom tritt nicht auf	0 Sekunden
1	Kurzzeitiges Auftreten	max. 10 Sekunden
2	Gelegentliches Auftreten	10 – 40 Sekunden
3	Überwiegendes Auftreten	mind. 40 Sekunden

3.1.4.8 Probenaufbereitung

Nach Entnahme der Blutproben wurden diese für den Versand an ein externes Untersuchungslabor aufbereitet, da dort die Probenanalytik erfolgte (Kapitel 3.1.4.10).

Alle Proben wurden zunächst bei Raumtemperatur aufbewahrt, wobei sie innerhalb von maximal zwei Stunden nach Entnahme abzentrifugiert wurden. Während die EDTA-Proben möglichst unmittelbar bearbeitet wurden, mussten die Serumröhrchen mindestens eine Stunde stehen, bis das Blut vollständig geronnen war. Die Zentrifugation erfolgte für 10 Minuten bei 1.570 g für die EDTA-Proben und 15 Minuten bei 1.539 g für die Serum-Proben. Genutzt wurde eine Hettich Zentrifuge (ROTINA 35).

Das überstehende Plasma beziehungsweise Serum wurde in native Probenversandröhrchen pipettiert und die Röhrchen mit entsprechenden Barcodes, die das externe Labor zur Verfügung stellte, versehen. Unmittelbar im Anschluss wurden sie bei -20°C tiefgefroren. Der Versand zum Labor erfolgte in gefrorener Form.

3.1.4.9 Blutuntersuchungen

Den Hauptzielparameter der eigenen Untersuchung stellte das ACTH dar. Zudem wurden als Nebenparameter Cortisol, Insulin, Glukose und die Schilddrüsenhormone T4, fT4 und fT3 ermittelt. Dabei erfolgte die Bestimmung der einzelnen Parameter nicht in jeder Probe sondern zu den jeweils als geeignet erscheinenden Probeentnahmezeitpunkten (

Tab. 7).

Da die Ausschüttung des ACTHs unmittelbar nach Injektion von TRH stimuliert wird und bei gesunden Pferden innerhalb von 45 Minuten wieder auf basale Werte abfallen soll (Funk et al. 2011) erfolgte die hormonelle Analytik für diesen Parameter lediglich bis einschließlich 120 Minuten post injectionem. Ebenso wurde mit den Parametern Cortisol, Insulin und Glukose verfahren. Für die Schilddrüsenhormone hingegen ist bekannt, dass Peaks infolge der TRH-Stimulation erst nach 2 – 6 Stunden zu erwarten sind (Breuhaus 2002). Diese Parameter wurden daher vor der TRH-Stimulation, also sowohl nüchtern (-120

Minuten) als auch gefüttert (0 Minuten bzw. basale Probe) und ab dem Probenzeitpunkt 30 Minuten bestimmt.

Tab. 7: Analysezeitpunkte für die jeweiligen Blutparameter.

Entnahmezeit- punkt (min)	ACTH	Cortisol	Insulin	Glukose	T4	ft4	ft3
Nüchtern (-120)	X	X	X	X	X	X	X
Basal (0)	X	X	X	X	X	X	X
5	X	X	X	X			
10	X	X	X	X			
15	X	X	X	X			
30	X	X	X	X	X	X	X
60	X	X	X	X	X	X	X
90	X	X	X	X	X	X	X
120	X	X	X	X	X	X	X
240					X	X	X
300					X ¹	X ¹	X ¹
360					X ¹	X ¹	X ¹

¹: ab Proband 4

Bei der initialen Versuchsplanung waren lediglich Blutprobenentnahmen bis 240 Minuten, also vier Stunden nach TRH-Injektion, vorgesehen. Da bei den ersten drei Probanden auffiel, dass sich manche Schilddrüsenhormone zu diesem Zeitpunkt noch im Anstieg zu befinden schienen, wurde die Versuchsdauer nach Zustimmung der genehmigenden Behörde ab Proband 4 um Blutentnahmen 300 und 360 Minuten nach TRH-Injektion ergänzt.

3.1.4.10 Analytik

Alle Parameter wurden vom Untersuchungslabor Biocontrol (Bioscientia, Institut für medizinische Diagnostik GmbH, Ingelheim) nach dort etablierten Verfahren bestimmt. Zur Bestimmung der Hormone wurden Chemilumineszenz-immunoassays genutzt. Der Analyt wird dabei in einem Immunkomplex

gebunden und über eine Chemilumineszenzreaktion quantifiziert. Die Prinzipien der Methodik werden im Folgenden näher erläutert. Die Angaben sind größtenteils den Arbeitsanweisungen bzw. den Informationsblättern zu den jeweiligen Laborgeräten entnommen, die bei einem persönlichen Besuch bei Biocontrol eingesehen werden konnten.

Für das Pferd fehlen speziesspezifische Testverfahren. Die an Humanseren etablierten Tests wurden vom Labor hinsichtlich des Auftretens von Matrixeffekten bei Messung von equinen Blutproben überprüft. Da solche Effekte nicht festgestellt werden konnten, können die anhand humaner Proben bestimmten Kennzahlen, wie Messbereich, Variationskoeffizienten und Kreuzreaktivitäten in etwa auf das Pferd übertragen werden. Im Einzelnen können diese dem Anhang (Kapitel 8.1) entnommen werden.

3.1.4.10.1 Messung von ACTH und T4

ACTH und T4 wurden mit einem Chemilumineszenz-Enzymimmunometrischen Assay (CLEIA) bestimmt. Der Testablauf erfolgte automatisiert durch den Immulite® 2000 (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH/Eschborn).

Das Messprinzip basiert auf der Bindung des jeweiligen Hormons an spezifische Antikörper (AK), die wiederum an Polystyrolkügelchen gebunden sind (Festphase). Mit alkalischer Phosphatase (AP) markierte, ebenfalls hormonspezifische AK einer anderen Spezies (nicht kompetitiver Assay, ACTH) bzw. markiertes Antigen (kompetitiver Assay, T4) werden hinzugefügt um die Immunkomplexe zu bilden. Durch Zugabe des Chemilumineszenz auslösenden Enzyms werden beim nicht kompetitiven Assay proportional, beim kompetitiven umgekehrt proportional zur in der Probe vorhandenen Hormonkonzentration Photonen emittiert und über Photonenverstärker registriert. Anhand von Standardkurven berechnet das System die jeweiligen Konzentrationen.

Im Einzelnen ist die Abfolge für die ACTH-Bestimmung (Immulite® 2000 ACTH; Bestellnummer L2KAC2) wie folgt: Die mit monoklonalen ACTH-Antikörpern der Maus beschichteten Polystyrolkugeln werden mit der Probe inkubiert. Anschließend werden polyklonale ACTH-Antikörper vom Kaninchen hinzugefügt,

die mit alkalischer Phosphatase konjugiert sind. Das zu bestimmende ACTH ist somit einerseits fest an die Kügelchen gebunden und andererseits von mit AP versehenen AK markiert. Durch Zugabe des Substrats Adamantylldioxetanphosphat wird die Chemilumineszenz induziert und darüber die gebundene Substanz quantifiziert (Babson 2013). Im Einzelnen wird das Adamantylldioxetanphosphat durch die an die Kugeln gebundene alkalische Phosphatase in ein instabiles Anionenzwischenprodukt dephosphoryliert. Beim Zerfall dieses instabilen Zwischenprodukts werden Photonen ausgesandt. Die Lichtemission, welche proportional zur Menge des in der Probe vorhandenen ACTHs ist, wird durch einen Photoverstärker erfasst und vom Gerät anhand entsprechender Kurven in eine Hormonkonzentration umgerechnet.

Für die Bestimmung von T4 (Immulite® 2000 Canine Total T4; Bestellnummer: L2KCT2) werden die mit monoklonalen anti-T4-Antikörpern der Maus beschichteten Polystyrolkugeln mit der Patientenprobe und mit AP markiertem T4 des Hundes inkubiert. Die Bildung der Immunkomplexe erfolgt somit unter einer Konkurrenzsituation zwischen dem zu bestimmenden Analyten und dem zugefügten T4 um die vorhandenen Antikörperstellen der Festphase. Anschließend wird die Chemilumineszenz durch Zugabe des Substrats, wie oben beschrieben, ausgelöst, wobei die Lichtemission aufgrund des kompetitiven Charakters umgekehrt proportional zur Konzentration des T4 in der Probe ist.

3.1.4.10.2 Messung von Insulin und Cortisol

Cortisol und Insulin werden mit dem ADVIA Centaur® XP (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH/Eschborn) bestimmt.

Dieses Gerät nutzt für die feste Phase paramagnetische Partikel (PMP). Es handelt sich dabei um mit spezifischen Antikörpern versehene Eisenoxidkristalle. Sie werden nach erfolgter Antikörper-Antigen-Reaktion durch Anlegen eines Magnetfelds an der Küvettenwand fixiert, wonach das System Proben- und Reagenzienbestandteile, die nicht an PMP gebunden sind, auswäscht. Im so genannten Lite-Reagenz, werden vom System Acridiniumester (AE) als Marker verwendet, welche an spezifische AK bzw. Antigen gebunden sind.

In Gegenwart von verdünntem Wasserstoffperoxid wird Acridiniumester über das labile Dioxetanon-Intermediat zu N-Methylacridon oxidiert, wobei es zur Lichtemission kommt. Diese wird vom System in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen und daraus die Konzentration des Analyten berechnet.

Im Einzelnen wird für die Bestimmung des Insulins (ADVIA Centaur® Insulin Assay; Bestellnummer: REF 02230141) die Probe mit dem Lite-Reagenz, welches mit AE markierte monoklonale Maus-anti-Insulin-AK enthält, 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend werden monoklonale anti-Insulin-AK der Maus, welche kovalent an PMP's gekoppelt sind als solide Phase hinzugefügt und die Suspension wird nochmals 2,5 Minuten bei derselben Temperatur inkubiert.

Durch Anlegen eines Magnetfeldes werden die Immunkomplexe (PMP-AK-Insulin-AK-AE) in einem weiteren Arbeitsschritt an der Küvettenwand fixiert. Überzählige Proben- und Reagenzienbestandteile werden dann in mehreren Waschschritten, die vom System vorgenommen werden, aus der Küvette entfernt, wobei die markierten Insulinmoleküle weiter wandständig bleiben. Die Chemilumineszenz-Reaktion wird laut Hersteller durch Hinzugeben von Säure und Base initiiert. Die Lichtemission in relativen Lichteinheiten (RLU) steht in direkter Beziehung zur Konzentration des Insulins, sodass das System die in der Probe enthaltene Insulinkonzentration berechnen kann.

Cortisol wird mithilfe eines kompetitiven Immunoassays (ADVIA Centaur® Cortisol Assay; Bestellnummer: REF 10994926) bestimmt. Im Lite-Reagenz befindet sich mit AE markiertes Cortisol. Dieses konkurriert während der 5-minütigen Inkubation bei 37°C mit dem in der Probe enthaltenen Cortisol um die Bindung an polyklonale Kaninchen-anti-Cortisol-AK in der festen Phase und bildet Immunkomplexe.

Der polyklonale Kaninchen-anti-Cortisol-AK bindet an monoklonale Maus-anti-Kaninchen-AK, welche kovalent an PMP gebunden sind. Nach Anlegen des Magnetfeldes und Waschung der Küvette mit entionisiertem Wasser wird die Chemilumineszenz-Reaktion ausgelöst. Die Lichtemission in RLU und die Cortisolkonzentration stehen aufgrund des kompetitiven Assays in umgekehrter Beziehung zueinander.

3.1.4.10.3 Glukosebestimmung

Glukose wird mit dem cobas c701 module (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim/D) bestimmt, welches über das photometrische Messprinzip arbeitet. Um Glukose in ein photometrisch messbares Produkt zu verwandeln, wird die enzymatische Referenzmethode mit Hexokinase verwendet. Das Prinzip beruht darauf, dass in einem ersten Schritt unter Verbrauch von ATP die Phosphorylierung von Glukose durch Hexokinase zu Glukose-6-Phosphat katalysiert wird. Im folgenden Schritt wird dieses in Gegenwart von NADP durch die Glukose-6-phosphatdehydrogenase zu 6-Phosphogluconat oxidiert, wobei zudem NADPH anfällt (Abb. 1)

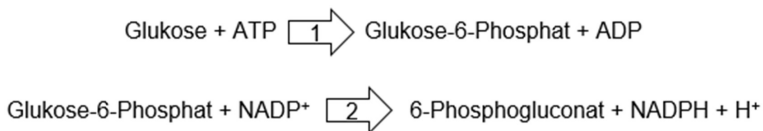


Abb. 1: Schema der enzymatischen Verstoffwechslung von Glukose in Anwesenheit von Hexokinase (1) und Glukose-6-Phosphat-dehydrogenase (2).

Das bei der Reaktion angefallene NADPH wird photometrisch gemessen und ist direkt proportional zu der in der Probe enthaltenen Glukose. Entsprechend der vom Gerät aufgezeichneten Stärke der Lichtemission berechnet dieses die Glukosekonzentration in der Probe.

3.1.4.10.4 Messung von fT3 und fT4

fT3 und fT4 wurden mit dem cobas® 8000 modular analyzer series/cobas e 801 module (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim/D) bestimmt. Es handelt sich für beide Hormone um einen kompetitiven Immunoassay.

Im cobas® 8000 werden in der flüssigen Phase für das Hormon spezifische AK, die mit Ruthenium-Komplex (Ruthenium-tris[bipyridil]-Salz) markiert sind, sowie biotinyliertes Antigen verwendet. Nachdem zunächst die Probe mit den markierten Antikörpern inkubiert wird, folgt danach die Zugabe von biotinyliertem

Antigen. Dieses bindet an sämtliche Bindungsstellen, die noch nicht durch Antigen aus der Probe besetzt sind.

Als Festphase werden mit Streptavidin beschichtete paramagnetische Mikropartikel verwendet. Streptavidin ist in der Lage mit einer hohen Affinität Biotin zu binden, sodass es zur Bindung der Immunkomplexe aus biotinyliertem Antigen mit Ruthenium-markierten AK an die Mikropartikel (Festphase) kommt. Mit Hilfe eines Magneten werden die Immunkomplexe an einer im System enthaltenen Arbeitselektrode angelagert und fixiert. Frei verbleibende Partikel können nun in Waschschritten aus dem System entfernt werden.

Für die Chemilumineszenzreaktion ist Tripropylamin essentiell. Das Amin wird ebenfalls vom System vorgehalten und nach den Waschschritten zur Probe hinzugegeben.

Durch Anlegen einer Spannung an die Elektrode wird über eine Redoxreaktion die Chemilumineszenz erzeugt (Abb. 2). Tripropylamin wird an der Elektrode oxidiert, was zur Entstehung eines Radikals führt, welches daraufhin spontan ein Wasserstoffatom abgibt. Durch Abgabe des Wasserstoffatoms fungiert das Radikal als starkes Reduktionsmittel, welches Ruthenium reduziert. Bei der Reduktion von $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ nimmt dieses einen elektrisch angeregten Zustand ein, der durch Lichtemission wieder in den Grundzustand übergeht. Diese wird mit dem Photomultiplier verstärkt und erfasst. Anhand einer Kalibrationskurve wird die Lichtemission in die Konzentration an fT3 bzw. fT4 in der Probe umgerechnet. Durch Oxidation von $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ an der Elektrode liegt erneut $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ vor, welches wieder in den Kreislauf eingeht (Huang et al. 2013).

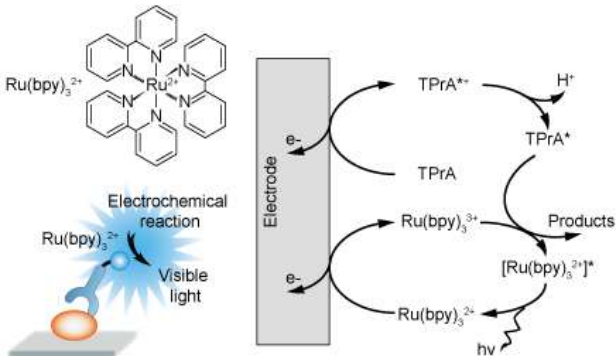


Abb. 2: Redoxreaktion an der Elektrode um Chemilumineszenz auszulösen, die zur Bestimmung der Konzentrationen von fT4 bzw. fT3 genutzt wird.

(<https://www.creative-diagnostics.com/Chemiluminescence-Immunoassay-guide.htm>, letzter Zugriff: Februar 2020)

Im Einzelnen ist die Abfolge für die Bestimmung von fT3 und fT4 wie folgt: In einem ersten Schritt wird die Probe mit dem spezifischen, an Ruthenium-Komplex gebundenen AK inkubiert. Für die Messung von fT3 (cobas® e 801 Elecsys FT3 III; Bestellnummer: REF 07027362190) werden monoklonale anti-T3-AK vom Schaf, für das fT4 (cobas® e 801 Elecsys FT4 II; Bestellnummer: 07027397190) polyklonale anti-T4-AK vom Schaf verwendet. In einem zweiten Inkubationsschritt werden biotinyliertes Antigen (T3 bzw. T4) und Streptavidin beschichtete Mikropartikel zugegeben, sodass noch freie Bindungsstellen des ruthenylierten Antikörpers besetzt werden (Abb. 3). Der Komplex wird über die Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung an die Festphase gebunden. Nach magnetischer Fixierung der Mikropartikel auf der Elektrode, Waschschritten und Anlegen der Spannung wird das emittierte Licht über einen Photomultiplier gemessen. Die Signalstärke verhält sich reziprok zur Analytkonzentration in der Probe und wird vom System berechnet.

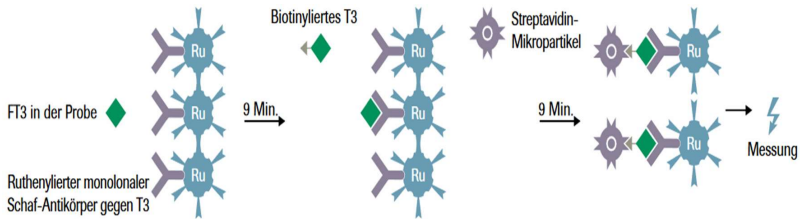


Abb. 3: Reaktionsprinzip des kompetitiven Immunoassay im cobas® 8000 modular analyzer series.

ft3 aus der Probe bindet an mit Ruthenium-Komplex markierte monoklonale anti-T3-AK vom Schaf. Im folgenden Inkubationsschritt bindet biotinyliertes T3 an nicht besetzte AK-Stellen. Über die Wechselwirkung zwischen Streptavidin und Biotin kommt es zur Anbindung an die feste Phase, wo schließlich die Chemilumineszenz ausgelöst wird.

(http://www.roche-diagnostics.ch/content/dam/corporate/roche-dia_ch/documents/broschueren/professional_diagnostics/serumarbeitsplatz/immunologie/schildddruesendiagnostik1/EN_T3_FactSheet.pdf, letzter Zugriff: März 2019)

3.1.5 Statistische Auswertung

Die Datenauswertung erfolgte auf den Rechnern im lokalen Netzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der JLU Gießen mit der Unterstützung des Leiters der AG, Herrn Dr. Klaus Failing. Das Statistikprogrammpaket BMDP/Dynamic, Release 8.1, (Dixon, 1993) wurde für die statistische Auswertung verwendet.

In einem ersten Schritt wurde aus den labordiagnostischen Messergebnissen die Fläche unter dem Zeitverlauf (Area under the Curve: AUC) des jeweiligen Parameters als neue Variable berechnet. Für ACTH, Cortisol, Insulin und Glukose erfolgte die Berechnung von der Basalprobe (Zeitpunkt 0 Minuten) ausgehend bis zum Zeitpunkt 90 Minuten nach TRH-Injektion. Auch für die Schilddrüsenhormone wurde mit der Basalprobe begonnen, die jeweiligen AUCs jedoch bis 360 Minuten bestimmt. Da für die Probanden 1 – 3 lediglich Werte bis einschließlich 240 Minuten nach TRH-Injektion vorlagen, gingen für die Schilddrüsenhormon AUCs die Daten von Proband 4 bis 11, also von 8 Individuen, in die Berechnung ein.

Zur statistischen Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den beiden TRH-Dosierungen beziehungsweise zwischen der Reihenfolge der Verabreichung wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen in der Cross-over Modifikation mit dem Programm BMDP2V durchgeführt.

Weiterhin wurde der Einfluss der Heufütterung auf die Parameter mit dem t-Test für abhängige Stichproben untersucht. Die Basis dafür bildeten die Mittelwerte zwischen Zeitpunkt nüchtern (-120 Minuten) und basal (0 Minuten) beider Dosierungsdurchgänge.

Die Untersuchung auf Zusammenhänge zwischen Tageslichtlänge, Alter der Probanden sowie Body Condition Scores mit den AUCs erfolgte durch Korrelations- bzw. Regressionsanalysen. Diese wurden unter Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) und der Regressionsgeraden ($y = mx + b$) mit dem Programm BMDP6D durchgeführt.

Um auf signifikante Unterschiede zwischen den beiden TRH-Dosierungen hinsichtlich des Auftretens von klinischen Symptomen zu prüfen wurde der Wilcoxon-Test für Paardifferenzen verwendet.

Wie üblich wurde für die Benennung der statistischen Signifikanzen das Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt. Entsprechend wurden Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

Die Ergebnisse im Text werden im Folgenden – soweit nicht anders angegeben – als arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen (MW $\pm$ SD) dargestellt. Die Abbildungen im Text wurden von der Autorin mit dem Programm Graph Pad Prism (Version 6) angefertigt.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Probandendaten

Alle 11 initial in die Studie eingeschlossenen Probanden (Tab. 8) beendeten diese ohne gesundheitliche oder sonst feststellbare Beeinträchtigung innerhalb der maximal vorgesehenen Studiendauer von 6 Wochen.

Tab. 8: Probandencharakteristika.

Nr.	Alter (Jahre)	Sex	KGW ¹ (kg)	BCS ² (Score)	Rasse	Datum 1.TRH-Test	Washout (Tage)
1	20	S	496	5	Polopony	21.11.2015	12
2	27	S	524	4	Warmblut	13.12.2015	6
3	19	W	525	3	Warmblut	20.02.2016	6
4	8	S	574	7	Warmblut	12.03.2016	7
5	10	S	501	5	Warmblut	30.03.2016	6
6	14	W	394	6	Reitpony	20.06.2016	6
7	17	S	501*	7	Arabermix	02.07.2016	9
8	11	S	521*	6	Arabermix	02.07.2016	9
9	7	S	528	6	Warmblut	18.10.2016	6
10	9	S	627	8	Tinker	25.11.2016	9
11	15	S	591	6	Warmblut	05.12.2016	14

¹: arithmetisches Mittel des Körpergewichts an beiden TRH-Tests

²: nach Henneke et al. (1985) mit Maximum von 9 Punkten

*: Körpergewicht mit Spiller Pferdemaßband bestimmt

S: Stute, W: Wallach

■: Kontrollpferde, denen Placebo (0,9 % NaCl) injiziert wurde

Die Probanden waren zwischen 7 und 27 Jahre (14 ± 6 Jahre) alt. Bei 9 der 11 Pferde handelte sich es um Stuten, die übrigen 2 Probanden waren Wallache. Den Großteil der Probandenpopulation bildeten Warmblüter (6 Pferde), aber auch andere Rassen wie je ein Tinker, Reitpony, Polopony sowie zwei Arabermix-Pferde gingen in die Untersuchung ein. Ihr Körpergewicht reichte von 388 – 632 kg (525 ± 60 kg). Der Body Condition Score lag bei $5,7 \pm 1,4$ von

maximal 9 erreichbaren Punkten, wobei die Spanne von 3 bis 8 Punkte reichte. Die Untersuchungen wurden zwischen dem 21.11.2015 und dem 20.12.2016 durchgeführt. Neun Probanden konnten in den Räumlichkeiten der JLU getestet werden, bei 2 Pferden erfolgten die Untersuchungen im Heimatstall.

3.2.2 Ergebnisse der klinischen und labordiagnostischen

Voruntersuchung

Die klinische Untersuchung der Probanden diente der Beurteilung des allgemeinen Gesundheitszustands. Es wurde dafür eine allgemeine Untersuchung mit Erfassung der Vitalparameter durchgeführt sowie die einzelnen Organsysteme gemäß der Lehre der klinischen Propädeutik untersucht.

Einzelne Probanden fielen dabei mit von der Norm abweichenden Befunden auf. So zeigte Proband 1 eine großflächige, teils depigmentierte Narbe über den gesamten Rücken, die aus einem 12 Jahre zurückliegenden Stallbrand resultierte. Bei der Herzauskultation von Proband 2 wurde eine unregelmäßige Bradyarrhythmie sowie sowohl ein systolisches, rauschendes Herzgeräusch Grad 2/5, als auch ein diastolisches Herzgeräusch Grad 3/5 festgestellt. Beide Befunde waren bereits vor der Untersuchung bekannt und in der Vergangenheit mittels EKG und Sonographie weiterführend abgeklärt worden. Ursächlich für die Unregelmäßigkeit ergaben sich eine Sinusarrhythmie bzw. AV Blöcke II. Grades, während die Geräusche durch das Vorliegen einer mittelgradigen Aorten- sowie Mitralklappeninsuffizienz erklärt werden konnten. Proband 3 hatte zum Zeitpunkt der Voruntersuchung hinten beidseits geringgradig Mauke, die sich in Abheilung befand. Bei Proband 7 wurde ein holosystolisches rauschendes Herzgeräusch Grad 4/5 links festgestellt, das dem Besitzer bereits bekannt, jedoch nicht weiterführend untersucht worden war. Die Stute zeigte dabei eine physiologische Herzfrequenz und keinerlei klinische Anzeichen einer Herzinsuffizienz. Proband 11 fiel auskultatorisch zeitweise mit einer unregelmäßig chaotischen Herzarrhythmie auf. Diese war im Vorfeld bereits mittels Elektrokardiogramm als vereinzelt auftretende, supraventrikuläre wie auch ventrikuläre Extrasystolen

bedingt diagnostiziert worden. Weiterhin zeigte die Stute sieben Tage nach der Testdurchführung mit 1 µg/kg TRH milde Koliksymptome, die keiner medikamentellen Therapie bedurften. Die Warmblutstute blieb in den Folgetagen ohne weitere Auffälligkeiten. Die zweite Dosierung von 2 µg/kg TRH wurde bei diesem Probanden acht Tage nach Auftreten der Koliksymptome getestet. Nach dem zweiten Test zeigte sich die Stute unauffällig – Koliksymptome wurden nicht erneut beobachtet.

Bei allen Befunden wurde davon ausgegangen, dass diese keinen Einfluss auf die Testergebnisse haben würden, sodass die Pferde an der Studie teilnehmen konnten.

Bei zwei weiteren Pferden ergaben die Voruntersuchungen, dass sie nicht in die Studie eingeschlossen werden konnten. So fiel eine Stute durch eine deutliche Stützbeinlahmheit im Schritt vorne links auf. Aufgrund des Schmerzgeschehens wäre die Beeinflussung der Testergebnisse möglich gewesen. Eine andere Stute zeigte sich bei den Manipulationen derart unkooperativ, dass aufgrund von Stressreaktionen auch hier von einer Beeinflussung der späteren Testergebnisse ausgegangen wurde.

Tab. 9: ACTH-Konzentrationen und Ergebnisse der Dexamethason-Suppressionstests bei allen Probanden ≥ 15 Jahren in der Voruntersuchung.

Proband	ACTH (pg/ml)	Cortisol _{basal} (µg/dl)	Cortisol _{supprimiert} (µg/dl)
1	21	1,0	< 0,5
2	19	1,9	< 0,5
3	12	1,0	< 0,5
7	23	1,2	< 0,5
11	19	1,0	< 0,5

Die labordiagnostischen Untersuchungen mit der Anfertigung der Hämatologie und klinischen Chemie sowie der basale ACTH-Wert zeigten sich bei allen elf Probanden unauffällig. Der bei fünf Probanden aufgrund des Alters von mindestens 15 Jahren zusätzlich durchgeführte Dexamethason-

Suppressionstest wies in allen Fällen eine physiologische Cortisol-suppression auf (Tab. 9).

3.2.3 TRH-Dosierungen im statistischen Vergleich

Mittels Varianzanalysen mit Messwiederholungen in der Cross-over Modifikation wurde geprüft, ob sich die Reaktionen von ACTH, Cortisol, Insulin und Glukose sowie der Schilddrüsenhormone je nach TRH-Dosis bzw. je nach der Reihenfolge, in denen die zwei Dosierungen verabreicht wurden unterschieden und ob eine Wechselwirkung zwischen diesen Einflussfaktoren bestand (Tab. 10). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden TRH-Dosierungen wurde ausschließlich für das freie T4 festgestellt ($p = 0,04$).

Tab. 10: Ergebnis der Varianzanalysen zum Einfluss der TRH-Dosierungen.

Variable (AUC)	Dosis-effekt	Reihenfolge-effekt	Wechselwirkung zwischen Dosis und Reihenfolge
ACTH	n.s.	n.s.	n.s.
Cortisol	n.s.	n.s.	n.s.
Insulin	n.s.	n.s.	n.s.
Glukose	n.s.	n.s.	n.s.
T4	n.s.	n.s.	n.s.
fT4	0,04	n.s.	n.s.
fT3	n.s.	n.s.	n.s.

n.s. = nicht signifikant

3.2.4 NaCl-Kontrolltests

Bei vier Probanden (Nr. 1, 2, 4 und 11) wurde zusätzlich zu den zwei Durchgängen mit den TRH-Dosierungen zuvor oder im Anschluss ein weiterer Test mit der Injektion von isotoner Natriumchloridlösung (Braun/Melsungen) als Placebo durchgeführt.

Die ACTH-Konzentrationen blieben mit 8 – 22 pg/ml bei allen vier Kontrolltieren über den gesamten Zeitverlauf im Referenzbereich, wobei sich individuelle Schwankungen um 3 (Proband 2), 6 (Proband 11 und 1) und 10 pg/ml bei Proband 4 ergaben (Abb. 4).

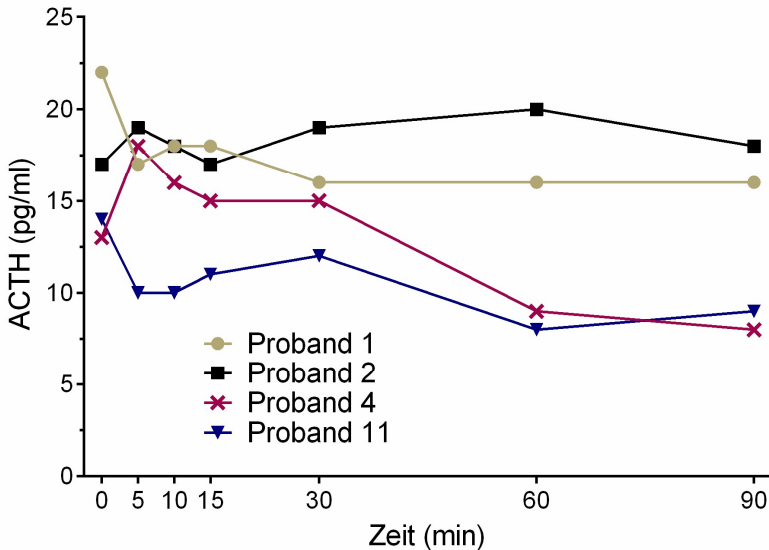


Abb. 4: ACTH-Verlauf der Probanden 1, 2, 4 und 11 nach Injektion von 0,9 %iger NaCl als Placebo zum Zeitpunkt 0.

Den auffälligsten Verlauf zeigte Proband 4 mit einem Maximalwert fünf Minuten post injectionem, wobei dieser nur 5 pg/ml oberhalb der zum Zeitpunkt 0 gemessenen Konzentration von 13 pg/ml lag.

Auch bei der Messung des Cortisols nach Placebo fiel Proband 4 auf. Mit einem Anstieg der Cortisolkonzentration ab dem Zeitpunkt 0 Minuten von 69 nmol/l auf 111 nmol/l nach 10 Minuten erreichte er nach 30 Minuten ein Maximum von 117 nmol/l, welches 1,7-fach oberhalb des Ausgangswerts lag. Im weiteren Verlauf sank das Cortisol wieder ab. Dies entspricht dem mittleren Verlauf der TRH-stimulierten Tiere (Kapitel 3.2.6). Die übrigen Kontrollpferde zeigten

kleinere Schwankungen in der Cortisolkonzentration, hinter denen aber kein einheitliches Schema zu erkennen war (Abb. 5).

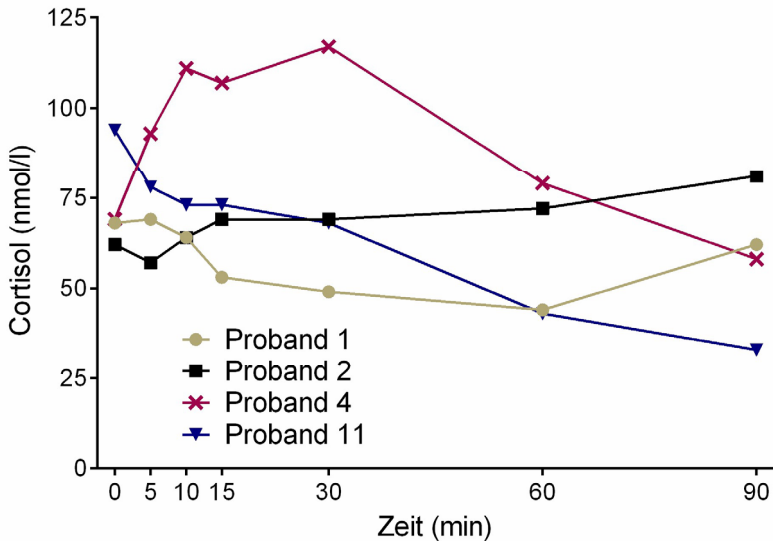


Abb. 5: Cortisol-Verlauf der Probanden 1, 2, 4 und 11 nach Injektion von 0,9 %iger NaCl als Placebo zum Zeitpunkt 0.

Bei den Schilddrüsenhormonen lagen nur für zwei der vier Kontrolltiere Daten für den gesamten Zeitraum vor, da die Blutprobennahmen bei Proband 1 und 2 nur bis einschließlich zum Zeitpunkt 240 Minuten post TRH stattfanden (Kapitel 3.1.4). Für T4 und fT4 wurden nur kleine intraindividuelle Schwankungen im Zeitverlauf (maximal um den Faktor 1,3 für T4 bzw. 1,2 für fT4) festgestellt, wobei sich die Hormonkonzentrationen zwischen den Individuen deutlich unterschieden (Abb. 6).

Die Konzentration des fT3 zeigte nach den Placebogaben größere intraindividuelle Streuungen (Abb. 7). Die Maximalwerte lagen bei Proband 4 und 11 um den Faktor 1,6 bzw. 1,8 oberhalb des Ausgangswertes, wobei der Zeitpunkt der Maxima mit 60 Minuten (Proband 11) und 300 Minuten (Proband

4) post injectionem sehr unterschiedlich war. Allerdings unterschieden sich die Werte in ihrer absoluten Höhe lediglich um 2,1 pmol/l.

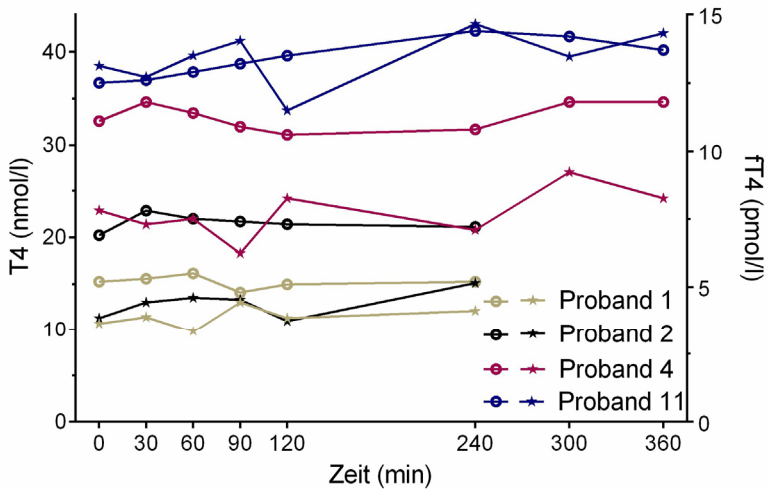


Abb. 6: Verlauf von T4 (Darstellung als Stern) und fT4 (Darstellung als Kreis) der Probanden 1, 2, 4 und 11 nach Injektion von 0,9 %iger NaCl als Placebo zum Zeitpunkt 0.

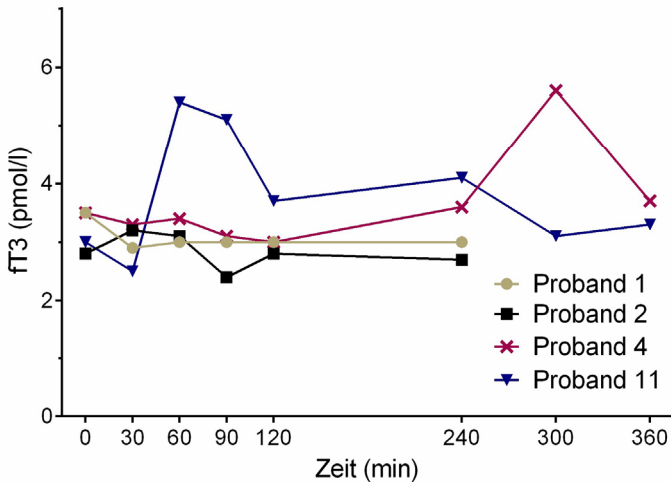


Abb. 7: fT3-Verlauf der Probanden 1, 2, 4 und 11 nach Injektion von 0,9 %iger NaCl als Placebo zum Zeitpunkt 0.

Sowohl die Insulin- als auch die Glukosekonzentrationen zeigten nach NaCl intraindividuell sehr ähnliche Verläufe, wie sie auch bei den Stimulationstests mit TRH bei den vier Kontrollpferden gemessen wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Ausnahme von Proband 4 mit einem maximalen Cortisolwert von 117 nmol/l nach 30 Minuten (Referenzbereich 28 - 185 nmol/l) keine erwähnenswerten Veränderungen infolge der NaCl-Injektion festgestellt wurden.

Unerwünschte Symptome nach TRH wurden bei keinem der vier Kontrolltiere post injectionem beobachtet, sodass alle jeweils mit einem Score von 0 bewertet wurden.

Hinsichtlich des Fütterungseinflusses lässt sich feststellen, dass die Kontrollpferde an den Placebo-Testtagen nüchtern und postprandial ganz ähnliche Laborwerte aufwiesen wie an jenen Tagen, an denen die TRH-Tests durchgeführt wurden. Daher wurde auf eine detaillierte Ergebnisdarstellung verzichtet.

3.2.5 ACTH

3.2.5.1 ACTH AUCs – Überblick

Die ACTH AUCs wiesen mit

3.823 ± 2.111 (923 – 7.660) pg/ml x 90 min nach 2 µg/kg TRH sowie

3.773 ± 2.176 (1.293 – 7.945) pg/ml x 90 min nach 1 µg/kg TRH

sehr ähnliche Werte auf. Es bestand weder ein statistisch signifikanter Einfluss der beiden TRH-Dosierungen ($p = 0,98$) noch der Reihenfolge der verabreichten Dosis ($p = 0,53$) oder hinsichtlich einer Wechselwirkung ($p = 0,12$).

Nach beiden Dosierungen wurden relativ hohe Standardabweichungen und Spannweiten beobachtet, die durch große interindividuelle Unterschiede hervorgerufen wurden.

3.2.5.2 ACTH AUCs – individueller Vergleich

Bei individueller Darstellung der ACTH AUCs nach 1 bzw. 2 µg/kg KGW fällt auf, dass diese intraindividuell mit Ausnahme der Probanden 1 und 8 recht ähnlich ausfallen (Abb. 8).

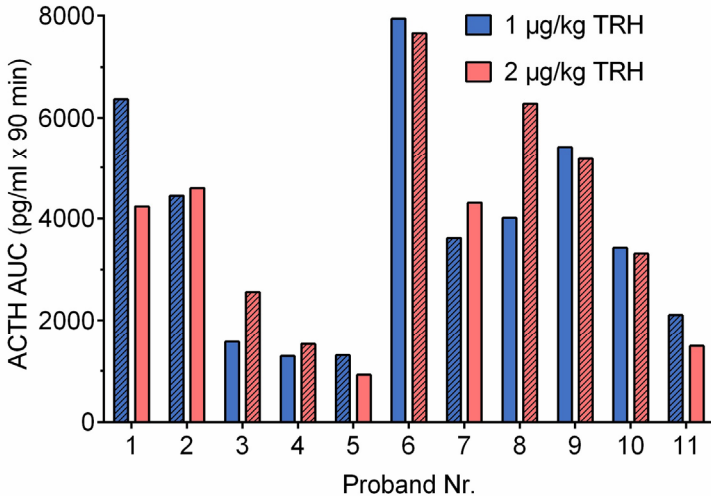


Abb. 8: ACTH AUCs aller Probanden nach beiden TRH-Dosierungen.
Statistisch kein signifikanter Dosis- bzw. Reihenfolgeeffekt ($p = 0,98$ bzw. $p = 0,53$). Schraffiert dargestellte AUCs repräsentieren die nach dem ersten Test erzielten Werte.

Wird die Dosis von 2 µg/kg TRH zugrunde gelegt und der prozentuale Unterschied der ACTH AUCs zwischen den beiden Dosen berechnet, so zeigen Proband 1, 3, 5, 8 und 11 die größten intraindividuellen Unterschiede (Abb. 9). Die ACTH AUC nach 1 µg/kg TRH weicht bei ihnen zwischen -38 bis +50 % von der nach 2 µg/kg TRH ab. Während bei den Probanden 3 und 8 die deutlich höhere AUC nach Verwendung der höheren TRH Dosis erreicht wurde, war es bei den Probanden 1, 5 und 11 die niedrige TRH-Dosierung, die zu einer größeren Stimulation führte.

In allen fünf Fällen war die Dosierung mit dem höheren AUC-Resultat diejenige, die als erstes verabreicht worden war. Die Überprüfung der absoluten Werte auf einen möglicherweise bestehenden Reihenfolgeeffekt ergab jedoch keine statistische Signifikanz ($p = 0,53$).

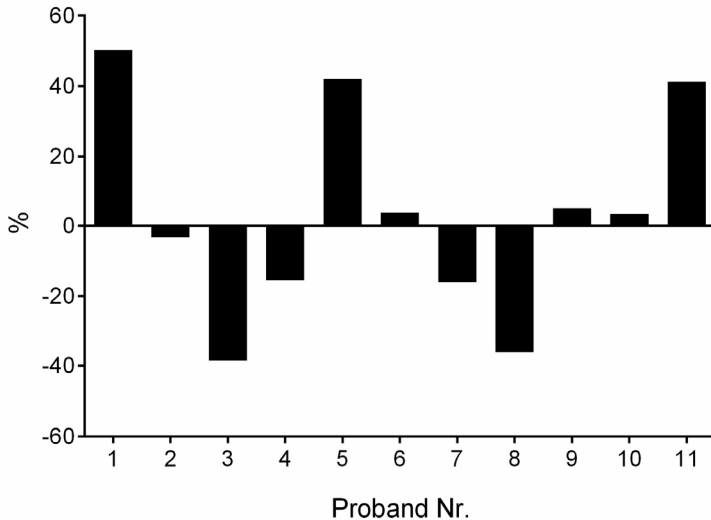


Abb. 9: Individueller prozentualer Unterschied der ACTH AUCs nach 2 µg/kg TRH (entspricht 0%) im Vergleich zu 1 µg/kg TRH.

3.2.5.3 ACTH-Werte und -verläufe

Alle eigenen Probanden wiesen basal (Zeitpunkt 0) für den jeweiligen Monat physiologische ACTH-Konzentrationen zwischen 6 und 31 pg/ml auf. Der Verlauf des ACTH nach intravenöser TRH-Injektion war – wie erwartet – durch einen Peak in der ersten Messung 5 Minuten nach der Stimulation gekennzeichnet. Wie in Abb. 10 verdeutlicht wiesen die stimulierten, absoluten ACTH-Werte große interindividuelle Streuungen auf. Sie lagen 5 Minuten nach Gabe von 2 µg/kg TRH um den Faktor 2,2 – 26,3 bzw. nach 1 µg/kg TRH um den Faktor 2,7 – 19,3 über dem Basalwert zum Zeitpunkt 0.

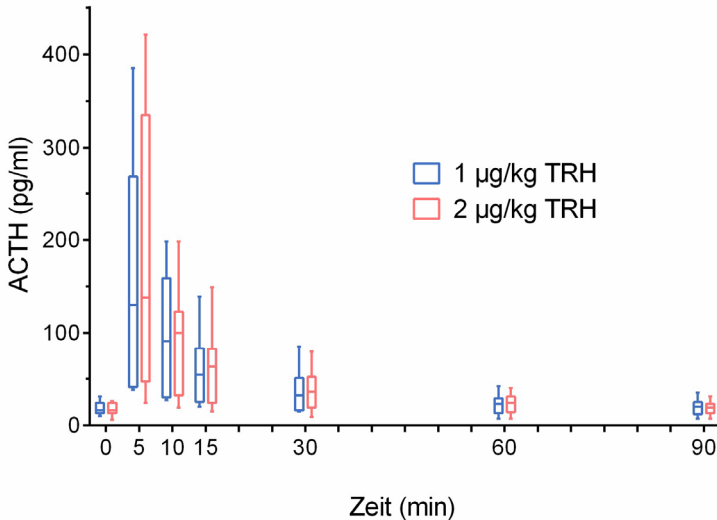


Abb. 10: ACTH-Verlauf aller Probanden nach Stimulation mit TRH zum Zeitpunkt 0.

Box Plot Darstellung mit Median, 25 % und 75 % Quartilen sowie Spannweiten.

Die medianen ACTH-Konzentrationen fielen nach dem Peak 5 Minuten nach TRH-Injektion relativ rasch wieder ab, sodass sie nach 15 Minuten noch etwa 50 % der Maximalwerte aufwiesen. Proband 7, 8 und 9, die alle mit sehr hohen Maximalwerten von 206 – 421 pg/ml auffielen, lagen zu diesem Zeitpunkt bereits nur noch bei Konzentrationen von 16 – 27 % der Maxima. Im weiteren Verlauf flachte die Kurve ab. In etwa die basalen Werte wurden 60 – 90 Minuten nach TRH-Injektion erreicht.

Auf den folgenden Seiten sind die individuellen ACTH- und Cortisolverläufe zusammen abgebildet, wobei letztere in Kapitel 3.2.6 näher beschrieben werden. Aufgrund der starken individuellen Unterschiede in der ACTH-Konzentration sei auf die unterschiedliche Skalierung der y-Achsen hingewiesen. Die Cortisolspiegel lagen dagegen bei allen Probanden in ähnlicher Höhe, sodass die Skalierung der z-Achse immer gleichbleiben konnte.

Bei Betrachtung der individuellen ACTH-Verläufe waren bei 4 der 11 Probanden trotz der unterschiedlichen Dosierungen erstaunlich gleichartige Hormonverläufe zu beobachten (Abb. 11 und Abb. 12).

In 4 von 7 Fällen wurde – wie erwartet – mit der höheren TRH-Dosis ein höherer ACTH-Peak erreicht, wie in Abb. 13 und Abb. 14 veranschaulicht. Die Stimulation mit der niedrigeren TRH-Dosis erbrachte bei ihnen Peaks, die um 19,1 – 44,2 % unterhalb der mit der doppelten Dosierung erzielten lagen. Allerdings wurde die ACTH-Freisetzung bei den 3 weiteren Probanden mit der Dosis von 1 µg/kg TRH stärker stimuliert als mit 2 µg/kg TRH (Abb. 15 und Abb. 16). Die Maximalwerte 5 Minuten nach TRH-Stimulation lagen bei ihnen um 41,4 – 87,5 % über den Peaks, die mit 2 µg/kg TRH erzielt wurden.

Bei 6 der 7 Probanden, die mit deutlich unterschiedlichen Peaks je nach Dosierung auffielen, war die jeweils höhere Stimulation mit der am ersten Testtag verabreichten TRH-Dosis erzielt worden. Eine statistische Signifikanz für einen Einfluss der Reihenfolge der Verabreichung konnte gleichwohl nicht gezeigt werden ($p = 0,53$).

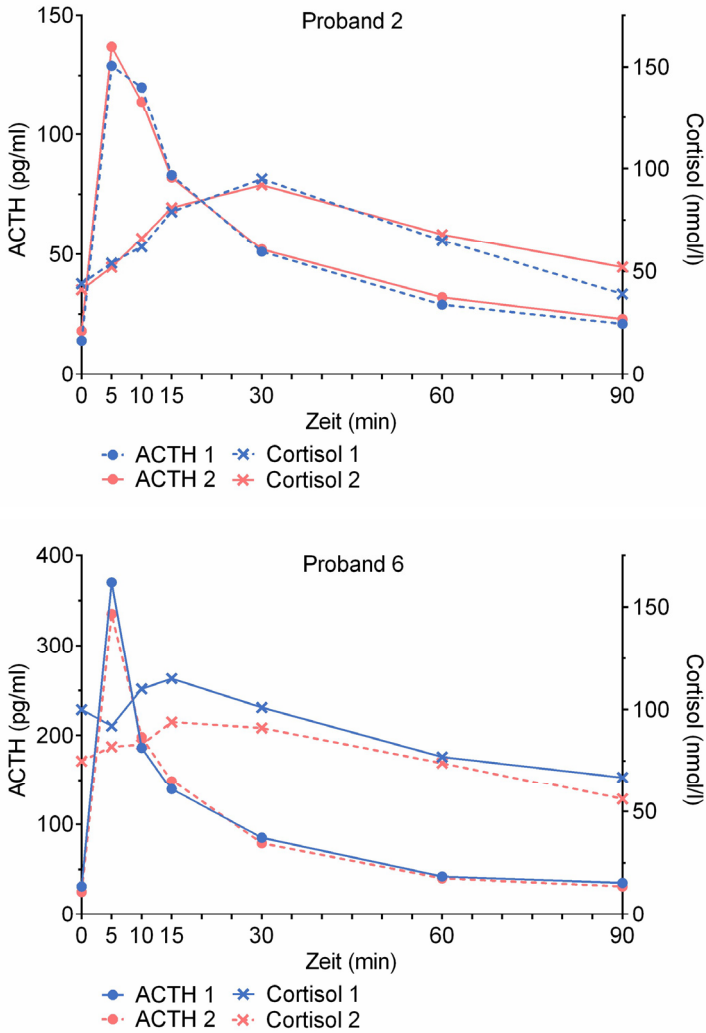


Abb. 11: Sehr ähnliche ACTH-Peaks nach beiden TRH-Dosierungen bei Proband 2 und 6.

Individueller ACTH- und Cortisol-Verlauf nach TRH-Stimulation zum Zeitpunkt 0 Minuten. 1 und 2 $\pm$ 1 und 2 μ g/kg TRH. Gestrichelt dargestellte Verläufe repräsentieren die nach dem ersten Test erzielten Werte.

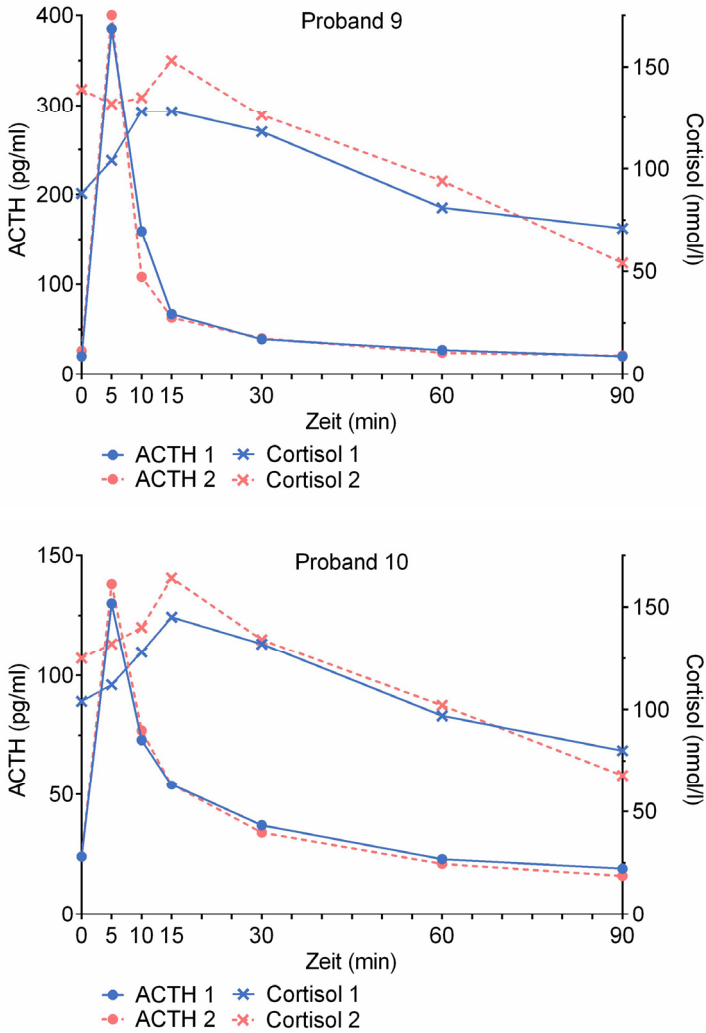


Abb. 12: Sehr ähnliche ACTH-Peaks nach beiden TRH-Dosierungen bei Proband 9 und 10.

Individueller ACTH- und Cortisol-Verlauf nach TRH-Stimulation zum Zeitpunkt 0 Minuten. 1 und 2 $\pm$ 1 und 2 μ g/kg TRH. Gestrichelt dargestellte Verläufe repräsentieren die nach dem ersten Test erzielten Werte.

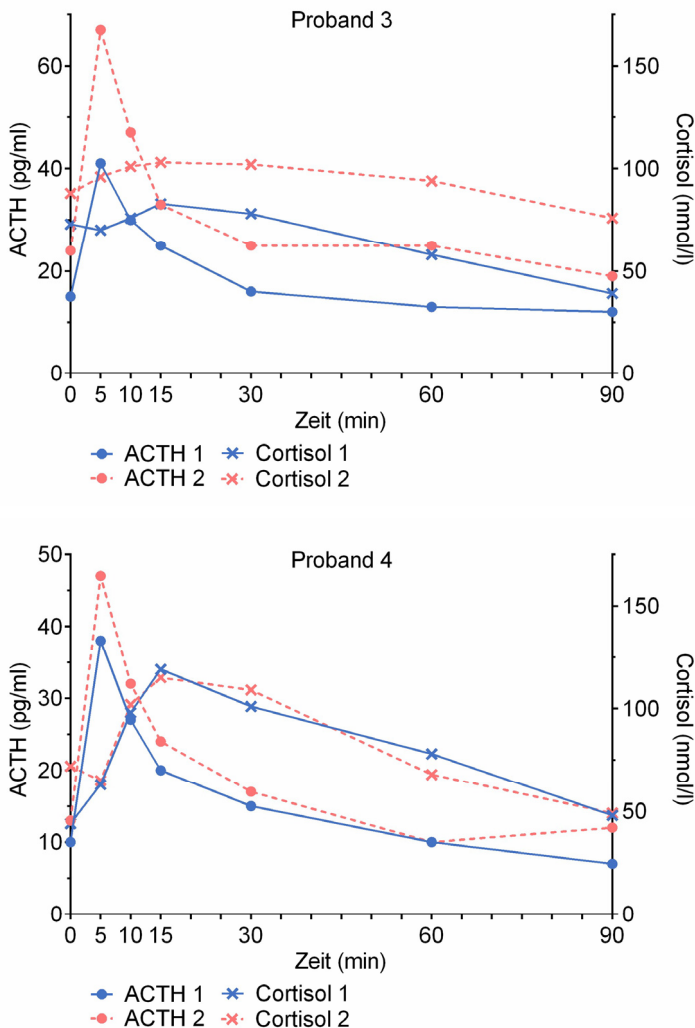


Abb. 13: Höherer ACTH-Peak nach 2 µg/kg TRH bei Proband 3 und 4.
 Individueller ACTH- und Cortisol-Verlauf nach TRH-Stimulation zum Zeitpunkt 0 Minuten. 1 und 2 $\pm$ 1 und 2 µg/kg TRH. Gestrichelt dargestellte Verläufe repräsentieren die nach dem ersten Test erzielten Werte.

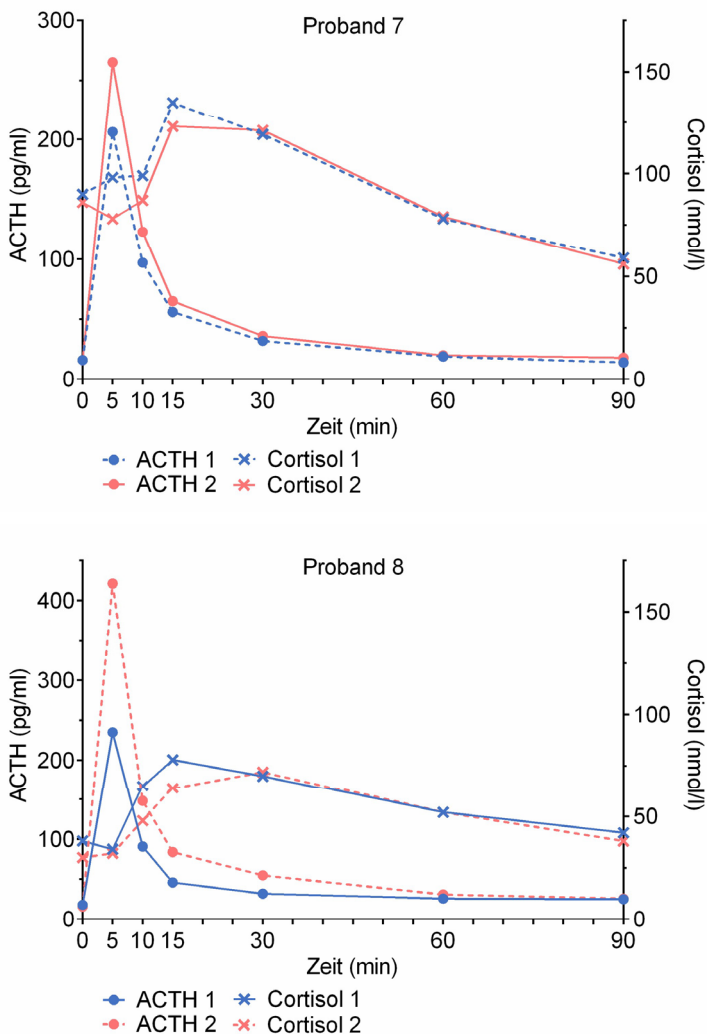


Abb. 14: Höherer ACTH-Peak nach 2 µg/kg TRH bei Proband 7 und 8.
 Individueller ACTH- und Cortisol-Verlauf nach TRH-Stimulation zum Zeitpunkt 0 Minuten. 1 und 2 $\pm$ 1 und 2 µg/kg TRH. Gestrichelt dargestellte Verläufe repräsentieren die nach dem ersten Test erhaltenen Werte.

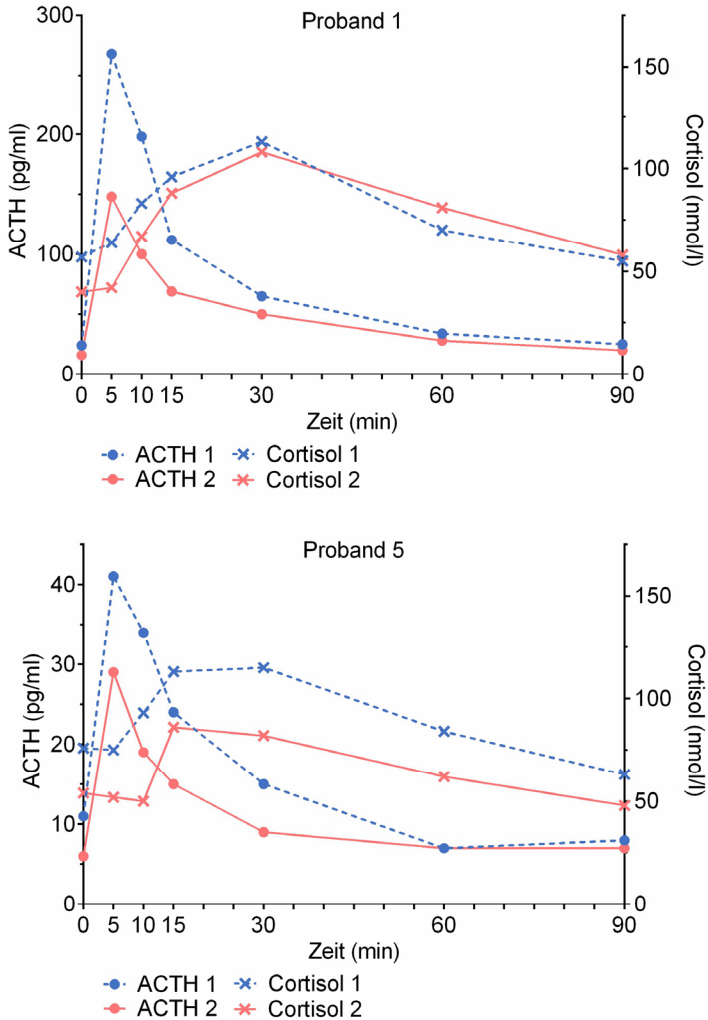


Abb. 15: Höherer ACTH-Peak nach 1 µg/kg KGW bei Proband 1 und 5.
 Individueller ACTH- und Cortisol-Verlauf nach TRH-Stimulation
 zum Zeitpunkt 0 Minuten. 1 und 2 $\pm$ 1 und 2 µg/kg TRH.
 Gestrichelt dargestellte Verläufe repräsentieren die nach dem
 ersten Test erzielten Werte

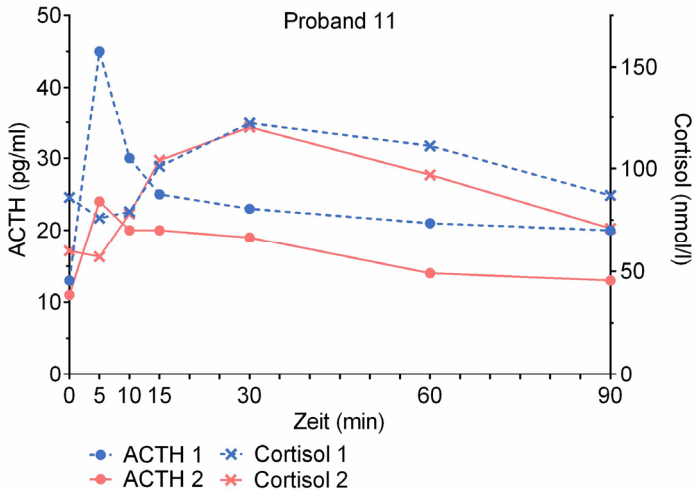


Abb. 16: Höherer ACTH-Peak nach 1 µg/kg TRH bei Proband 11.
 Individueller ACTH- und Cortisol-Verlauf nach TRH-Stimulation zum Zeitpunkt 0 Minuten. 1 und 2 $\triangleq$ 1 und 2 µg/kg TRH. Gestrichelt dargestellte Verläufe repräsentieren die nach dem ersten Test erzielten Werte.

3.2.5.4 Beurteilung der ACTH-Werte nach heutigen Cutoffs

Bisher werden in der Literatur mehrere Cutoffs vorgeschlagen um zwischen gesunden und an PPID erkrankten Pferden zu unterscheiden. Nach Beech et al. (2007) gilt eine Erkrankung an PPID bei Pferden mit ACTH-Werten von über 100 pg/ml 10 Minuten und von über 35 pg/ml 30 Minuten nach TRH-Stimulation als „highly likely“. Von Durham et al. (2014) wird ein Cutoff von > 110 pg/ml 10 Minuten nach TRH-Stimulation angegeben, um PPID-betroffene Pferde von Gesunden zu unterscheiden.

Diese bisher vorgeschlagenen Zeitpunkte, die herangezogen werden um zwischen Gesunden und an PPID erkrankten Pferden zu unterscheiden sind in Tab. 11 mit den individuellen Ergebnissen der einzelnen Probanden sowie des jeweiligen Testdatums aufgeführt.

Tab. 11: Individuelle ACTH-Werte 10 und 30 Minuten nach TRH-Stimulation.

Markierung von Werten über bisher vorgeschlagenen Cutoffs zur Unterscheidung zwischen Gesunden und an PPID erkrankten Pferden

fett*: $ACTH_{10\text{ min}} > 110\text{ pg/ml}$ (Durham et al. 2014).

fett: $ACTH_{10\text{ min}} > 100\text{ pg/ml}$ und $ACTH_{30\text{ min}} > 35\text{ pg/ml}$ (Beech et al. 2007).

Nr.	1 µg TRH / kg KGW			2 µg TRH / kg KGW		
	Datum	$ACTH_{10\text{min}}$	$ACTH_{30\text{min}}$	Datum	$ACTH_{10\text{min}}$	$ACTH_{30\text{min}}$
6	27.06.	186*	85	20.06.	198*	79
1	21.11.	198*	65	04.12.	100	50
9	25.10.	159*	39	18.10.	108	40
2	13.12.	120*	51	20.12.	114*	52
8	12.07.	91	32	02.07.	148*	55
7	02.07.	97	32	12.07.	123*	36
10	05.12.	73	37	25.11.	77	34
3	27.02.	30	16	20.02.	47	25
11	05.12.	30	23	20.12.	20	19
4	20.03.	27	15	12.03.	32	17
5	30.03.	34	15	06.04.	19	9

Von den 22 bei klinisch unauffälligen sowie durch basale ACTH-Werte bzw. DST als nicht an PPID erkrankt beurteilten Pferden durchgeführten Stimulationstests wären demnach 9 (41 %) als positiv zu bewerten. Die positiven Testergebnisse zeigten 6 der 11 Probanden (55 %). Drei der 6 Probanden zeigten unabhängig von der TRH-Dosis in beiden Testdurchläufen ein Resultat, das über den Cutoffs lag, während die übrigen 3 Probanden nur bei einer Dosierung (Proband 1 nach 1 µg/kg TRH und Proband 7 und 8 nach 2 µg/kg TRH) die Cutoffs überschritten. Durham et al. (2014) wiesen darauf hin, dass aufgrund der in den Herbstmonaten auftretenden hormonellen Umstellungen der TRH-Test diagnostisch nicht

verwendet werden sollte. Aufgrund bisheriger Publikationen ist bereits der August als „Herbst“ anzusehen – in den entsprechenden Zeitraum fällt ausschließlich Proband 9.

3.2.6 Cortisol

3.2.6.1 Cortisol AUCs – Überblick

Bezüglich der Cortisol AUCs bestand statistisch kein signifikanter Einfluss der TRH Dosierung ($p = 0,79$), der Reihenfolge der verabreichten Dosis ($p = 0,85$) oder hinsichtlich einer Wechselwirkung ($p = 0,15$).

Folglich wiesen die Cortisol AUCs mit

7.700 ± 1.515 (5.135 bis 9.990) nach 1 $\mu\text{g/kg}$ TRH, bzw.

7.655 ± 1.624 (4.865 bis 10.407) nach 2 $\mu\text{g/kg}$ TRH

unabhängig von der verwendeten TRH-Dosis sehr ähnliche Werte auf. Die relativ große Spannweite resultiert aus den interindividuellen Unterschieden zwischen den Probanden (Abb. 17).

3.2.6.2 Cortisol AUCs – individueller Vergleich

Vergleicht man die intraindividuellen Cortisol AUCs zwischen beiden Dosierungen zeigten 9 der 11 Probanden nur geringe Unterschiede (Abb. 17).

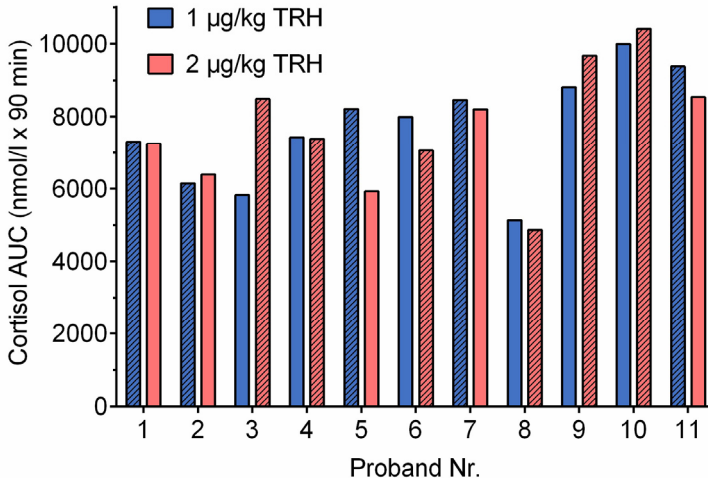


Abb. 17: Cortisol AUCs aller Probanden nach beiden TRH-Dosierungen.
 Statistisch kein signifikanter Dosis- bzw. Reihenfolgeeffekt ($p = 0,79$ bzw. $p = 0,85$). Schraffiert dargestellte AUCs repräsentieren die nach dem ersten Test erzielten Werte.

Vergleichsweise große intraindividuelle Unterschiede zwischen beiden Dosierungen fielen bei den Probanden 3 und 5 auf, wobei die höhere Cortisol AUC bei Proband 3 nach Stimulation mit 2 µg/kg TRH und bei Proband 5 mit 1 µg/kg TRH erzielt wurde. Diese Dosen entsprachen bei beiden Probanden derjenigen, mit der auch die höhere ACTH AUC erzielt wurde.

In Abb. 18 sind für alle Probanden sowohl die ACTH AUCs als auch die Cortisol AUCs dargestellt. Die Cortisol AUCs der Probanden 1, 8 und 11 zeigten intraindividuell für beide Dosierungen jeweils sehr ähnliche Ergebnisse, obwohl ihre ACTH AUCs deutliche Unterschiede je nach TRH-Dosis aufwiesen.

Proband 5 und 6 zeigten im interindividuellen Vergleich – vor allem mit der Dosierung von 1 µg/kg TRH – vergleichbare Cortisol AUCs, wobei Proband 5 für das ACTH die niedrigste und Proband 6 die höchste AUC aufwies. Ein Rückschluss von der Höhe der ACTH AUC auf die Höhe der Cortisol AUC scheint folglich nicht möglich zu sein. Dies spiegelt sich auch in den

Korrelationskoeffizienten zwischen ACTH AUC und Cortisol AUC von 0,006 nach Stimulation durch 1 µg/kg TRH bzw. -0,181 nach 2 µg/kg TRH wider.

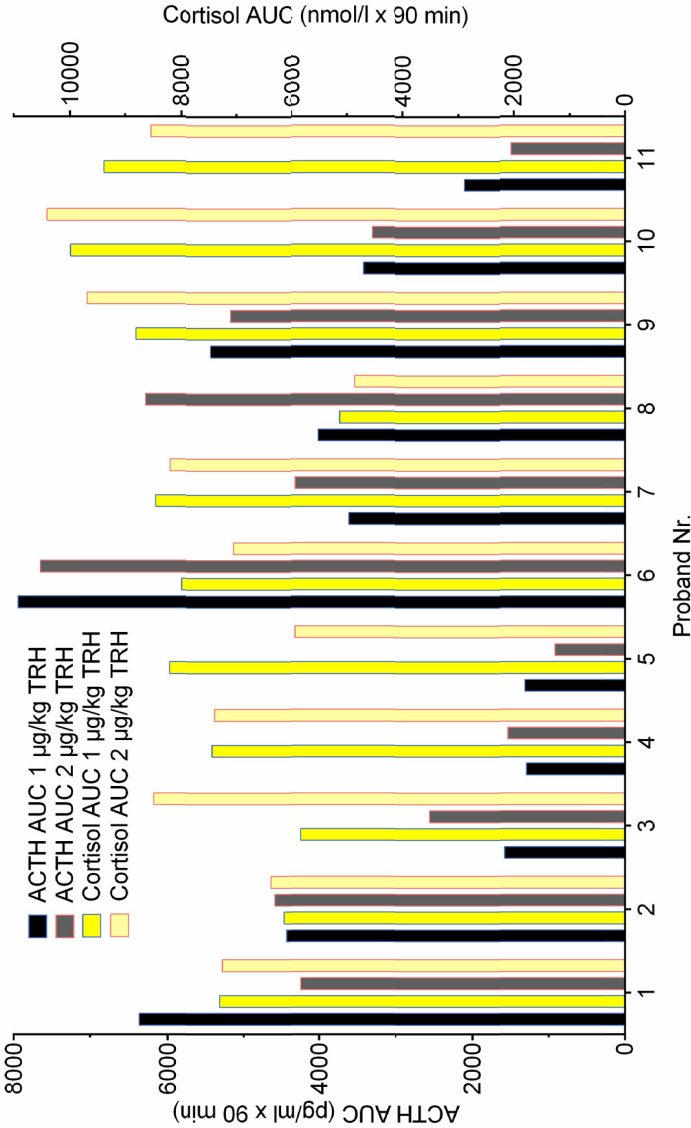


Abb. 18: ACTH AUC (pg/ml x 90 min) und Cortisol AUC (nmol/l x 90 min) nach beiden TRH-Dosierungen (1 und 2 µg/kg TRH).

3.2.6.3 Cortisolwerte und –verläufe

Die basale Cortisolkonzentration (Zeitpunkt 0) lag mit 73 ± 29 (30 – 139) nmol/l für alle Probanden innerhalb des vom Labor angegebenen Referenzbereiches von 28 – 185 nmol/l.

In Abb. 19 sind die Cortisolverläufe aller Probanden als Box-Plots dargestellt. Nach einem initialen Anstieg zeigten sich nach 15 oder 30 Minuten Maxima, die im Median vergleichbar sind. Die Streuung der Konzentrationen war dabei nach 30 Minuten deutlich geringer als 15 Minuten nach TRH-Injektion. Nach 60 bis 90 Minuten waren in etwa wieder die Ausgangskonzentrationen erreicht.

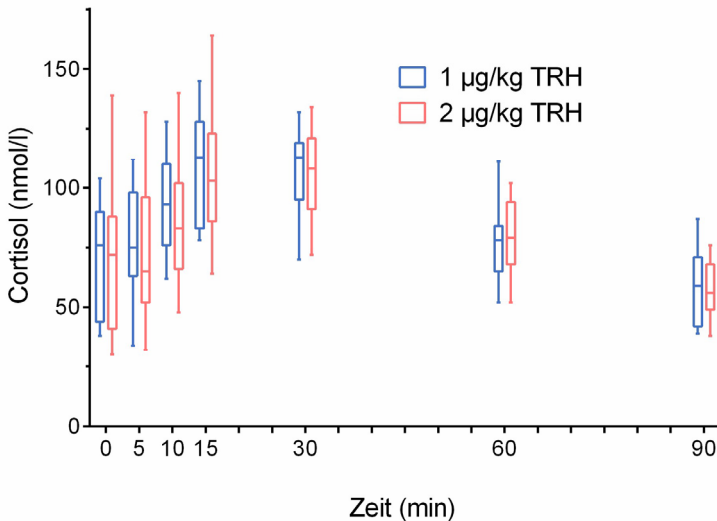


Abb. 19: Cortisol-Verlauf aller Probanden nach Stimulation mit TRH zum Zeitpunkt 0.

Box Plot Darstellung mit Median, 25 % und 75 % Quartilen sowie Spannweiten.

Betrachtet man die individuellen Cortisolverläufe, so zeigten alle Probanden nach fünf oder spätestens nach 10 Minuten einen Anstieg der Cortisolkonzentration. Die Maximalwerte wurden bei 7 Probanden nach 15 Minuten, bei den anderen

vier nach 30 Minuten erreicht. Unabhängig von der verwendeten TRH-Dosis war der Zeitpunkt des Maximalwerts für 9 der 11 Pferde in beiden Stimulationstests identisch. Dementsprechend erreichten zwei Probanden (Proband 5 und 8) ihre individuellen Maxima infolge der beiden TRH-Dosierungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Proband 5 fiel nach 2 µg/kg TRH mit einem Maximum nach 15 Minuten und nach 1 µg/kg TRH nach 30 Minuten auf. Bei Proband 8 zeigte sich dies entgegengesetzt (Maximum nach 30 Minuten infolge 1 µg/kg TRH und 15 Minuten nach 2 µg/kg).

Die maximal erreichten Konzentrationen aller Probanden lagen für beide Dosierungen in ähnlicher Größenordnung um den Faktor 1,1 – 2,7 oberhalb der Ausgangswerte.

Im weiteren Verlauf zeigte sich ein kontinuierlicher Abfall der Cortisolkonzentration, sodass die Ausgangswerte 60 bzw. spätestens 90 Minuten nach TRH-Gabe wieder erreicht bzw. sogar unterschritten wurden.

3.2.7 Insulin

3.2.7.1 Insulin AUCs Überblick

Im Hinblick auf die Insulin AUCs bestand statistisch kein signifikanter Einfluss der beiden TRH-Dosierungen ($p = 0,70$), der Reihenfolge der verabreichten Dosis ($p = 0,06$) oder hinsichtlich einer möglichen Wechselwirkung ($p = 0,74$).

Dementsprechend zeigten die Insulin AUCs mit

4.420 ± 3.476 (916 – 12.835) pmol/ x 90 min nach 1 µg/kg TRH sowie

4.126 ± 2.997 (1.018 – 11.230) pmol/l x 90 min nach 2 µg/kg TRH sehr ähnliche Werte. Nach beiden Dosierungen fielen relativ hohe Standardabweichungen sowie Spannweiten auf, die durch große interindividuelle Unterschiede zu erklären sind.

3.2.7.2 Insulin AUCs – Individueller Vergleich

In der Darstellung der Insulin AUCs für beide TRH-Dosierungen wiesen 8 der 11 Probanden intraindividuell nur kleine Unterschiede auf (Abb. 20).

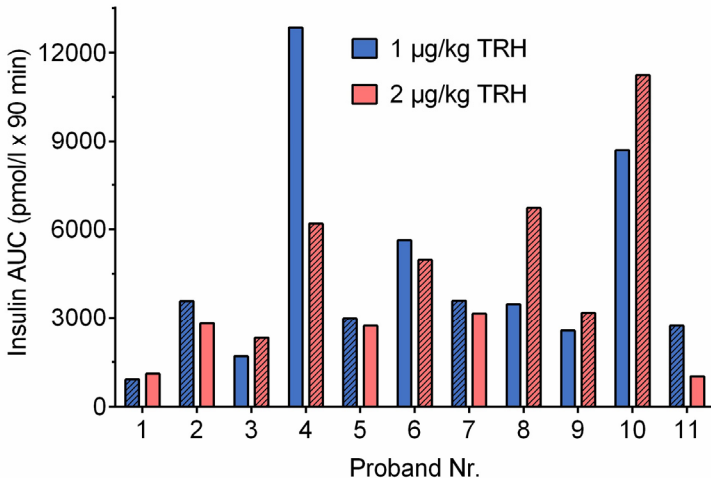


Abb. 20: Insulin AUCs aller Probanden nach beiden TRH-Dosierungen.
Statistisch kein signifikanter Dosis- bzw. Reihenfolgeeffekt ($p = 0,70$ bzw. $p = 0,06$). Schraffiert dargestellte AUCs repräsentieren die nach dem ersten Test erzielten Werte.

Wurde die Insulin AUC nach Stimulation mit 2 µg/kg TRH gleich 0 % gesetzt, so zeigten diese acht Probanden individuelle prozentuale Unterschiede zu 1 µg/kg TRH zwischen -27,1 und +27,8 %. Trotz der optisch auffälligen Diskrepanz der absoluten Werte bei Proband 10 wies dieser in seinen Insulin AUCs prozentual lediglich einen Unterschied von -22,8 % auf. Auffallend große intraindividuelle Unterschiede zwischen ihren Insulin AUCs nach den beiden TRH-Dosierungen fanden sich bei den Probanden 4, 8 und 11. Sie zeigten prozentuale Unterschiede in ihren AUCs von +107,3; -48,4 und +166,5 %.

3.2.7.3 Insulinwerte und -verläufe

Alle eigenen Probanden wiesen zwei Stunden vor den 22 TRH-Tests (Nüchternprobe, -120 min) – und damit vor Gabe der kleinen Heuration – Insulinwerte auf, die innerhalb des vom Labor intern bestimmten Referenzbereichs, von 6,0 – 78,6 pmol/l lagen. Die basalen Insulinwerte

(Zeitpunkt 0) direkt vor TRH-Testbeginn lagen dann zwischen 11,8 und 155,0 pmol/l. Zu dem Einfluss der Fütterung siehe Kapitel 3.2.11.

Betrachtet man die absoluten Insulinkonzentrationen von den einzelnen Individuen fällt auf, dass für Proband 4, 8, 10 und 11 (also überwiegend jenen Pferden, die intraindividuell deutlich unterschiedliche AUCs aufwiesen) bereits vor Gabe des TRH stark unterschiedliche Insulin-Ausgangswerte gemessen wurden (Tab. 12). Der Betrag der Differenz beider Insulin-Ausgangswerte ist bei diesen Probanden deutlich höher als bei jenen, die nur geringe Unterschiede in ihren Cortisol-AUCs aufwiesen.

Tab. 12: Betrag der Differenz zwischen den Insulin-Ausgangswerten (in pmol/l) zum Zeitpunkt 0 vor Stimulation mit 1 bzw. 2 µg/kg TRH für alle elf Probanden.

Proband Nr.	Δ Insulin
10	62,8
8	47,6
4	40,5
11	32,0
6	14,5
5	9,9
9	9,6
2	7,7
1	3,5
7	2,2
3	1,5

Die maximale Insulinkonzentration zeigten alle Probanden entweder in der Basalprobe (0 min), 5, 10 oder 15 Minuten nach der TRH-Applikation, also bis spätestens 135 min nach der Heugabe. Danach nahmen die Konzentrationen langsam stetig wieder ab, sodass 300 min nach Heugabe (90 min nach TRH-Applikation) bei 20 der 22 Messungen die Insulinkonzentrationen zum Teil sogar deutlich unterhalb der Werte zum Zeitpunkt 0 lagen.

In Tab. 13 sind die Konzentrationen des Insulins unmittelbar vor TRH-Injektion (0 min) sowie die intraindividuellen Spannweiten aufgeführt, die sich während der nächsten sechs Messungen (bis einschließlich 90 min) im Testverlauf ergaben. Es zeichnet sich ab, dass der Range bei höheren Ausgangskonzentrationen des Insulins höher lag als bei niedrigen Ausgangskonzentrationen. Proband 10 bildet mit einer kleinen Spannweite trotz hoher Ausgangskonzentrationen nach Stimulation mit 1 µg/kg TRH eine Ausnahme.

Tab. 13: Insulin (pmol/l) vor Heugabe ($Insulin_{n\ddot{u}}$), vor Stimulation mit TRH (0 Minuten) und Schwankungsbreite über die folgenden 90 Minuten (6 Messungen).

1 µg/kg TRH				2 µg/kg TRH			
Nr.	$Insulin_{n\ddot{u}}$	$Insulin_0$	Range ₀₋₉₀	Nr.	$Insulin_{n\ddot{u}}$	$Insulin_0$	Range ₀₋₉₀
1	12,7	11,8	4,9	1	13,1	15,3	6,1
2	25,9	46,0	18,5	2	25,2	38,3	10,2
3	11,7	22,8	9,3	3	21,1	24,3	12,0
4	31,7	121,0	64,0	4	43,0	80,5	33,1
5	16,4	45,2	38,2	5	14,0	35,3	34,1
6	17,5	42,1	31,3	6	12,6	56,6	35,6
7	19,6	58,1	36,8	7	24,9	55,9	33,8
8	27,2	66,4	37,9	8	33,1	114,0	84,9
9	19,0	29,1	20,7	9	20,9	38,7	22,0
10	50,2	92,2	13,8	10	70,3	155,0	90,5
11	20,6	44,6	19,3	11	11,5	12,6	3,9

Annähernd konstante Insulinwerte über die 90 Minuten nach TRH-Injektion mit einem intraindividuellen Range < 14 pmol/l wurden bei 7 der 22 Messungen beobachtet. Bei 12 der 22 Verläufe zeigten sich kleinere Schwankungen der Insulinkonzentration von bis zu 38,2 pmol/l. Bei 3 Messungen (Proband 4, 8 und 10) wurden sehr große Konzentrationsunterschiede mit Spannweiten von 64,0; 84,9 und 90,5 pmol/l festgestellt.

3.2.8 Glukose

3.2.8.1 Glukose AUCs

Hinsichtlich der Glukose AUCs bestand statistisch kein signifikanter Einfluss der beiden TRH-Dosierungen ($p = 0,62$), der Reihenfolge der verabreichten Dosis ($p = 0,08$) oder einer möglichen Wechselwirkung ($p = 0,78$).

So zeigten die Glukose AUCs mit

504 ± 75 (411 – 647) mmol/l x 90 min nach 2 µg/kg TRH sowie

495 ± 67 (417 – 630) mmol/l x 90 min nach 1 µg/kg TRH sehr ähnliche

Werte. Im Vergleich zu den anderen Parametern fallen die interindividuellen Unterschiede in den Glukose AUCs gering aus (Abb. 21).

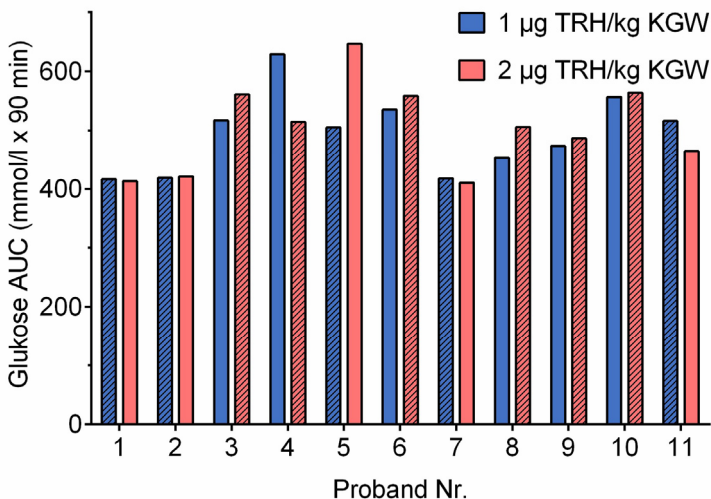


Abb. 21: Glukose AUCs aller Probanden nach beiden TRH-Dosierungen.

Statistisch kein signifikanter Dosis- bzw. Reihenfolgeeffekt ($p = 0,62$ bzw. $p = 0,08$). Schraffiert dargestellte AUCs repräsentieren die nach dem ersten Test erzielten Werte.

Im intraindividuellen Vergleich zeigten 6 Probanden (1, 2, 6, 7, 9 und 10) sehr ähnliche Glukose AUCs nach beiden TRH-Dosierungen. Der prozentuale

Unterschied der AUC nach 1 µg/kg TRH im Vergleich zu 2 µg/kg TRH (entspricht 0 %) lag bei ihnen lediglich zwischen -4,1 und +1,8 %. Bei weiteren 3 Probanden wurden nur kleine Unterschiede zwischen -10,6 und +11,1 % beobachtet. Deutliche Unterschiede waren bei Proband 4 (+22,3 %) und 5 (-21,8 %) zu sehen.

3.2.8.2 Glukosewerte und –verläufe

Die Ausgangskonzentration der Glukose zum Zeitpunkt 0 Minuten lag mit 4,4 – 8,5 mmol/l in 16 der 22 Messungen oberhalb des laborintern bestimmten Referenzbereichs von 3,1 – 5,1 mmol/l. Nach TRH-Injektion zeigte sich die Blutglukosekonzentration mit Schwankungen, die bei den einzelnen Probanden unterschiedlich stark ausfielen. Insgesamt blieb die Konzentration über den gesamten Testverlauf von 90 Minuten aber recht konstant. In 20 der 22 Messungen variierten die Werte um insgesamt maximal 1,5 mmol/l. Bei den zwei weiteren Messungen wurden stärkere Schwankungen bis zu 2,3 bzw. 3,8 mmol/l festgestellt.

Beim Vergleich der Glukosekonzentrationen zum Zeitpunkt 0 und nach 90 Minuten zeigte sich in 20 Messungen ein geringfügiger Abfall von $5,8 \pm 1,0$ mmol/l auf $5,3 \pm 0,6$ mmol/l. In den zwei übrigen Messungen, beide von Proband 7, waren Anfangs- und Endwert für die Dosierung von 1 µg/kg TRH konstant (4,8 mmol/l) bzw. zeigten nach 2 µg/kg TRH einen leichten Anstieg von 4,4 mmol/l auf 4,6 mmol/l.

3.2.9 Schilddrüsenhormone

In die Auswertung der Schilddrüsenhormone gingen die Daten von 8 der 11 Probanden ein, da Proband 1 – 3 jeweils nur bis zum Zeitpunkt 240 Minuten nach TRH-Injektion getestet worden waren (Kapitel 3.1.4).

3.2.9.1 Schilddrüsenhormone – Überblick über die AUCs

Im Hinblick auf einen Einfluss der TRH-Dosis auf die AUC der Schilddrüsenhormone wurde lediglich für fT4 eine statistische Signifikanz festgestellt ($p = 0,04$). So zeigte sich die fT4 AUC mit 5.468 ± 1.258 ($3.551 - 6.861$) pmol/l x 360 min nach 1 µg/kg TRH niedriger als jene nach 2 µg/kg TRH mit 6.221 ± 1.354 ($4.961 - 8.484$) pmol/l x 360 min.

Wie in der Tab. 14 aufgeführt lagen auch die AUCs der anderen beiden Hormone (T4 und fT3) nach 2 µg/kg TRH jeweils über derjenigen nach 1 µg/kg TRH. Allerdings konnte hier kein statistisch signifikanter Einfluss der TRH-Dosis festgestellt werden.

Tab. 14: AUCs für T4, fT4 und fT3 nach 1 bzw. 2 µg/kg TRH.
MW $\pm$ SD (range), $n = 8$.

	AUC		p-Wert
	1 µg/kg TRH	2 µg/kg TRH	
T4	12.899 ± 4.214 (6.489 – 17.154)	14.876 ± 5.009 (8.069 – 22.743)	0,08
fT4	5.468 ± 1.258 (3.551 – 6.861)	6.221 ± 1.354 (4.961 – 8.484)	0,04
fT3	3.139 ± 719 (2.396 – 4.371)	3.673 ± 1.313 (2.241 – 5.934)	0,10

Für keines der Schilddrüsenhormone wurde ein statistisch signifikanter Einfluss der Reihenfolge der verabreichten TRH-Dosis ($p = 0,43$ für T4; $p = 0,20$ für fT4 und $p = 0,08$ für fT3) oder möglicher Wechselwirkungen ($p = 0,35$ für T4; $p = 0,15$ für fT4 und $p = 0,09$ für fT3) beobachtet.

Bei allen 3 Hormonen zeigten sich relativ hohe Spannweiten, die durch große interindividuelle Unterschiede zu erklären sind. Auf diese wird in den folgenden Kapiteln weiter eingegangen.

3.2.9.2 T4

3.2.9.2.1 T4 AUCs – individueller Vergleich

Bei Betrachtung der intraindividuellen Unterschiede der T4 AUCs zwischen beiden TRH-Dosierungen fällt auf, dass diese bei 5 der 8 Probanden relativ klein ausfallen (Abb. 22). Die Probanden 5, 6 und 8 dagegen zeigten größere prozentuale Unterschiede zwischen den beiden Dosierungen von -19,6 bis -26,5 %, wobei die Dosis von 2 µg/kg TRH als 0 % zugrunde gelegt wurde. Die höhere AUC wurde bei diesen drei Tieren jeweils mit der höheren TRH-Dosis erzielt, wobei insgesamt kein statistisch signifikanter Einfluss der TRH-Dosis nachgewiesen werden konnte.

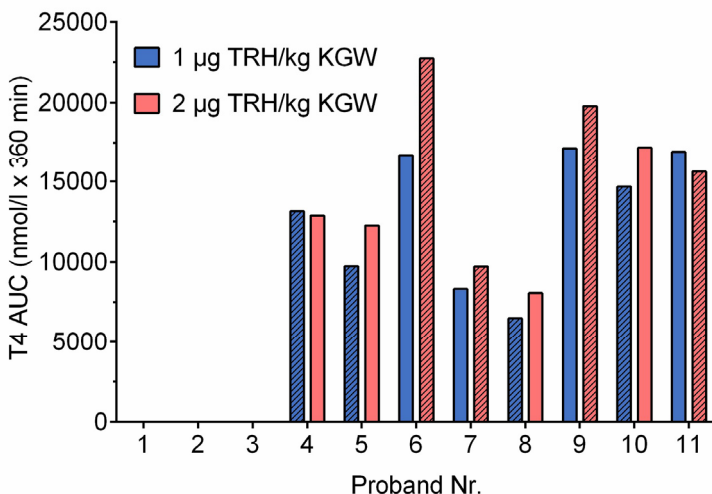


Abb. 22: T4 AUCs der Probanden 4 – 11 nach beiden TRH-Dosierungen. Statistisch kein signifikanter Dosis- bzw. Reihenfolgeeffekt ($p = 0,08$ bzw. $p = 0,44$). Schraffiert dargestellte AUCs repräsentieren die nach dem ersten Test erzielten Werte.

3.2.9.2.2 T4-Werte und –verläufe

Die Basalwerte von 7 der 8 Probanden betrugen zwischen 14,2 – 39,6 nmol/l und liegen damit im vom Labor festgesetzten Referenzbereich, der mit 12,9 – 45,0 nmol/l angegeben wird. Bei Proband 8 lag die T4-Konzentration zum Zeitpunkt 0 in beiden Tests unterhalb der Bestimmungsgrenze von 6,4 nmol/l.

Zur besseren Übersicht ist in Tab. 15 aufgeführt, wann bei den einzelnen Probanden Minimal- bzw. Maximalkonzentrationen auftraten.

Tab. 15: Zeitpunkt des Auftretens der Minimal- bzw. Maximalkonzentration des T4 – untergliedert nach verwendeter TRH-Dosis.

	Zeitpunkt (Minuten)	1 µg/kg TRH (Proband Nr.)	2 µg/kg TRH (Proband Nr.)	Summe (Probandenanzahl)
Minimum	0	4, 8, 9, 11	4, 7, 8, 9	8
	30	5, 6, 7,	5, 6, 10, 11	7
	60	10		1
Maximum	240	4, 5, 8	6, 7	5
	300	6, 7, 9, 11	5, 9, 10, 11	8
	360	10	4, 8	3

Auffällig ist, dass in 7 Messungen der niedrigste Wert erst 30 Minuten, bei Proband 10 sogar erst eine Stunde nach TRH-Injektion gemessen wurde.

Die maximal erreichten Konzentrationen lagen bei 7 Probanden 1,5 – 2,9-fach oberhalb der basalen Werte. Für Proband 8 lagen die Faktoren mit 5,6 bei 1 µg TRH bzw. 7,8 bei 2 µg TRH im Vergleich zu den anderen Pferden deutlich höher.

Bei der intraindividuellen Betrachtung des Zeitpunkts, zu dem die Maximalkonzentration erreicht wurde, fällt auf, dass dieser nur bei 2 der 8 Probanden (Proband 9 und 11) für beide TRH-Dosierungen identisch war. Während er für 4 der 6 Probanden um 60 Minuten differierte, lagen bei Proband 4 und 8 sogar zwei Stunden zwischen den Zeitpunkten ihrer Maxima bei den beiden TRH-Dosierungen.

3.2.9.3 fT4

3.2.9.3.1 fT4 AUC – individueller Vergleich

In der Betrachtung der intraindividuellen Unterschiede der AUCs nach Stimulation mit den zwei TRH-Dosierungen fällt auf, dass mit Ausnahme von Proband 11 die höhere AUC immer mit 2 µg/kg TRH erzielt wurde (Abb. 23). Für diesen Zusammenhang konnte eine statistische Signifikanz gezeigt werden ($p = 0,04$).

Die deutlichsten Unterschiede zeigten Proband 7, 8 und 9. Bei ihnen liegt die AUC nach 1 µg/kg TRH um 19 – 29 % unterhalb derjenigen nach 2 µg/kg TRH.

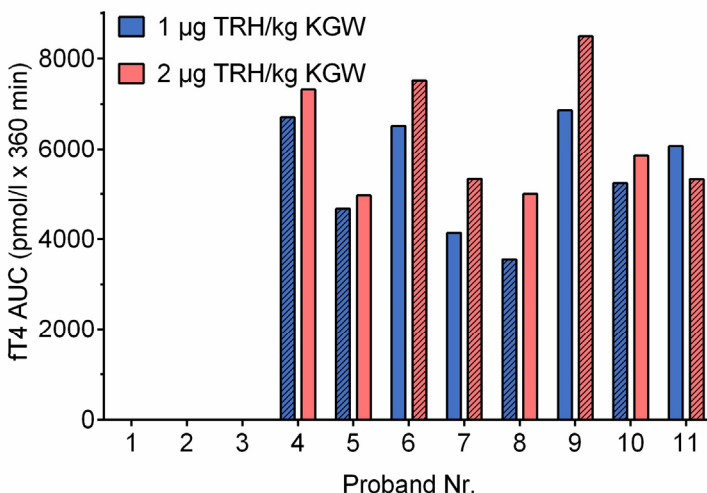


Abb. 23: fT4 AUCs der Probanden 4 – 11 nach beiden TRH-Dosierungen. Statistisch signifikanter Dosisseffekt ($p = 0,04$). Statistisch kein signifikanter Reihenfolgeeffekt ($p = 0,20$). Schraffiert dargestellte AUCs repräsentieren die nach dem ersten Test erzielten Werte.

3.2.9.3.2 fT4-Werte und –verläufe

Die Ausgangskonzentration zum Zeitpunkt 0 wurde für 7 der 8 Probanden zwischen 8,5 – 15,5 pmol/l bestimmt und befand sich innerhalb des vom Labor angegebenen Referenzbereichs von 6,5 – 20,6 pmol/l. Proband 8 fällt wie auch

schon bei T4 mit niedrigeren Hormonkonzentrationen auf. Im Test mit 1 µg/kg TRH lag seine basale fT4-Konzentration zum Zeitpunkt 0 unterhalb der laboreigenen Bestimmungsgrenze von 3,9 pmol/l. Im zweiten Testlauf dieses Probanden konnte mit 4,6 pmol/l zwar eine Konzentration ermittelt werden, jedoch lag diese unterhalb des Referenzbereichs.

Wie in Tab. 16 detaillierter aufgeführt, stellte die basal bestimmte fT4-Konzentration in 11 der 16 Messungen zugleich die Minimalkonzentration dar. In den sonstigen 5 Messungen wurde diese 30 Minuten nach TRH-Injektion festgestellt.

Im weiteren Testverlauf folgte ein Konzentrationsanstieg, wobei der Zeitpunkt des Maximums zwischen den Individuen variierte (Tab. 16). Während er in 15 der 16 Messungen zwischen 240 und 360 Minuten lag wurde bei Proband 5 der Maximalwert schon nach 120 Minuten gemessen.

Mit Ausnahme von Proband 8 lagen die Maximalkonzentrationen 1,5 – 2,4-fach oberhalb der Basalwerte. Wie auch schon für T4 befanden sich die Faktoren bei Proband 8 mit 5,1 für 1 µg/kg TRH bzw. 4,4 für 2 µg/kg TRH deutlich oberhalb jener der anderen Probanden.

Tab. 16: Zeitpunkt des Auftretens der Minimal- bzw. Maximalkonzentration des fT4 – untergliedert nach verwendeter TRH-Dosis.

	Zeitpunkt (Minuten)	1 µg/kg TRH (Proband Nr.)	2 µg/kg TRH (Proband Nr.)	Summe (Probandenanzahl)
Minimum	0	5, 7, 8, 9, 10	4, 7, 8, 9, 10, 11	11
	30	4, 6, 11	5, 6	5
Maximum	120		5	1
	240	5, 6, 8, 9	7	5
	300	4, 7, 10	4, 9, 11	6
	360	11	6, 8, 10	4

Nur bei einem der 8 Probanden war der Zeitpunkt des maximalen fT₄ nach beiden TRH-Dosierungen identisch. Bei 4 der 7 Pferde differierten die Zeitpunkte um 60 Minuten, bei den übrigen 3 Pferden sogar um 120 Minuten.

Bis zum Testende 360 Minuten nach TRH-Stimulation blieben die fT₄-Konzentrationen mit 12,8 – 28,4 pmol/l bei allen Probanden oberhalb der Ausgangskonzentrationen.

3.2.9.4 fT₃

3.2.9.4.1 fT₃ AUCs – individueller Vergleich

Werden die Effekte der beiden Dosierungen auf die fT₃ AUCs intraindividuell dargestellt, wiesen die Probanden 5, 7, 10 und 11 sehr ähnliche AUCs auf (Abb. 24). Die größten intraindividuellen Unterschiede fielen bei den Probanden 4, 6 und 8 auf. Bei ihnen differierten die nach der TRH-Stimulation resultierenden AUCs um -16 bis -32 %, wobei die Dosis von 2 µg/kg TRH als 100 % angenommen wurde. Bei allen Probanden, bei denen deutlichere intraindividuelle Unterschiede zwischen den AUCs bestanden, wurde die größere AUC mit 2 µg/kg TRH erzielt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden TRH-Dosierungen konnte für diesen Parameter dennoch nicht festgestellt werden ($p = 0,1$).

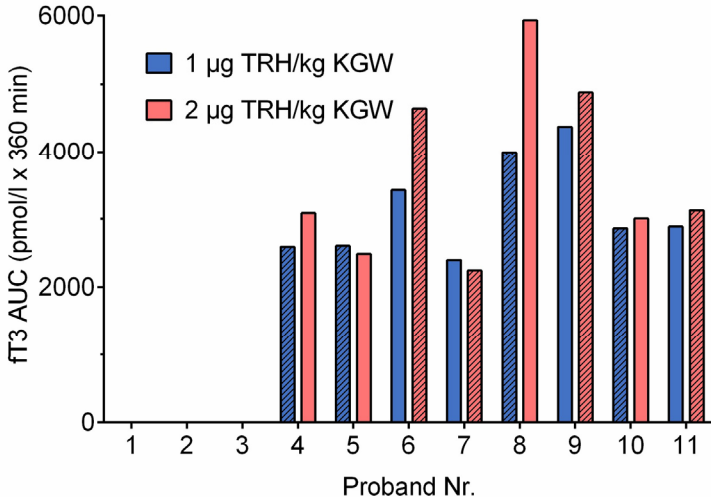


Abb. 24: fT3 AUCs der Probanden 4 – 11 nach beiden TRH-Dosierungen.
 Statistisch kein signifikanter Dosis- bzw. Reihenfolgeeffekt ($p = 0,10$
 bzw. $p = 0,08$). Schraffiert dargestellte AUCs repräsentieren die nach
 dem ersten Test erzielten Werte.

3.2.9.4.2 fT3-Werte und –Verläufe

Für fT3 wird vom Labor kein Referenzbereich angegeben, sodass es nicht möglich war die an den eigenen Probanden erhobenen Konzentrationen dementsprechend einzuordnen. Die fT3-Konzentration zum Zeitpunkt 0 lag für die Probanden 4 – 11 zwischen 3,0 – 5,5 pmol/l und war zugleich – abgesehen von einer der 16 Messungen – die Minimalkonzentration. Proband 8, der im Vergleich mit den anderen Probanden sowohl für T4 als auch fT4 mit deutlich niedrigeren Konzentrationen aufgefallen war, zeigte für fT3 mit 4,9 bzw. 5,5 pmol/l für beide TRH-Dosierungen im interindividuellen Vergleich die höchsten Ausgangskonzentrationen.

Wie Tab. 17 zeigt wurde der maximale fT3-Wert nach TRH in der überwiegenden Anzahl an Messungen (14 von 16) nach 90 oder 120 Minuten erreicht. Nur bei jeweils einer Messung wurden die Maximalwerte bereits nach 60 bzw. erst nach 240 Minuten festgestellt. Die maximal erreichten Konzentrationen lagen für beide

Dosierungen vergleichbar um den Faktor 2,0 – 5,2-fach für 1 µg/kg TRH bzw. 2,2 – 5,0-fach für 2 µg/kg TRH oberhalb der Basalkonzentrationen.

Tab. 17: Zeitpunkt des Auftretens der Minimal- bzw. Maximalkonzentration des fT3 – untergliedert nach verwendeter TRH-Dosis.

	Zeitpunkt (Minuten)	1 µg/kg TRH (Proband Nr.)	2 µg/kg TRH (Proband Nr.)	Summe (Probandenanzahl)
Minimum	0	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	4, 5, 7, 8, 9, 10, 11	15
	30		6	1
Maximum	60	11		1
	90	5, 9	4, 7, 8	5
	120	4, 6, 7, 8, 10	5, 6, 9, 11	9
	240		10	1

Im weiteren Verlauf fiel die fT3-Konzentration bei allen Probanden stetig ab, wobei lediglich Proband 7 bis zum Versuchsende annähernd wieder seine Ausgangswerte (Faktor 1,1 bzw. 1,2 der Konzentration zum Zeitpunkt 0 Minuten) erreichte. Die weiteren sieben Pferde wiesen bis zur letzten Messung Konzentrationen auf, die mit dem Faktor 1,5 – 3,1 noch recht deutlich oberhalb ihrer Ausgangswerte lagen.

3.2.9.5 Schilddrüsenhormone im zeitlichen Vergleich

In Abb. 25 sind die Hormonverläufe der verschiedenen Schilddrüsenhormone über den Zeitraum bis 360 Minuten nach TRH-Stimulation beispielhaft für die Dosis von 2 µg/kg TRH dargestellt. Aufgrund der großen Ähnlichkeit der entsprechenden Grafik nach 1 µg/kg TRH wurde auf diese Abbildung verzichtet. Für T4 und fT4 fielen ähnliche Kurvenverläufe auf. Beide Hormone zeigten nach 240 Minuten hohe Konzentrationen, die im Median nach 300 und 360 Minuten bestehen blieben. Die Maximalwerte von fT3 wurden mit 90 – 120 Minuten nach TRH-Injektion deutlich früher erreicht, woraufhin die Konzentration im weiteren Versuchsablauf wieder abfiel.

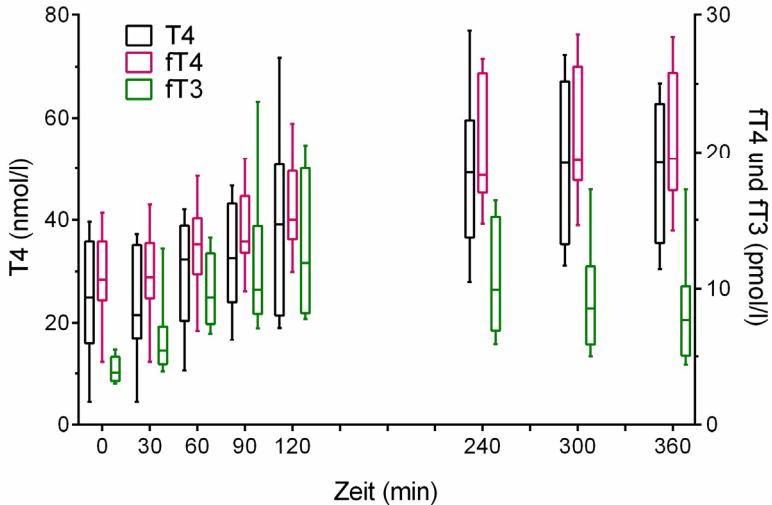


Abb. 25: Verlauf der Schilddrüsenhormone der Probanden 4 – 11 nach Stimulation mit 2 µg/kg TRH zum Zeitpunkt 0 Minuten.

3.2.10 Auftreten unerwünschter Symptome nach TRH

An den Testtagen wurden bei 21 der 22 durchgeführten Stimulationen mit TRH unerwünschte Symptome bei den Probanden beobachtet. Die Scorepunkte zeigten mit $3,2 \pm 1,9$ nach 1 µg/kg TRH bzw. $3,5 \pm 2,1$ nach Gabe von 2 µg/kg TRH ähnliche Ergebnisse. Der Gesamtscore, der sich durch Addition der Scorepunkte aller Probanden ergab, war mit 38 Punkten nach 1 µg/kg TRH bzw. 40 Punkten nach 2 µg/kg TRH für beide Dosierungen fast identisch. Ein statistisch signifikanter Unterschied im Auftreten der Symptome in Abhängigkeit von der TRH-Dosis wurde dementsprechend nicht festgestellt ($p = 0,34$). Eine Reduktion der auftretenden unerwünschten Wirkungen durch Halbierung der verwendeten TRH-Dosis ist den Untersuchungsergebnissen zufolge nicht erfolgt. In Abb. 26 ist das Auftreten der einzelnen Symptome prozentual am Gesamtscore der unerwünschten Wirkungen von allen Probanden für die jeweilige TRH-Dosis dargestellt.

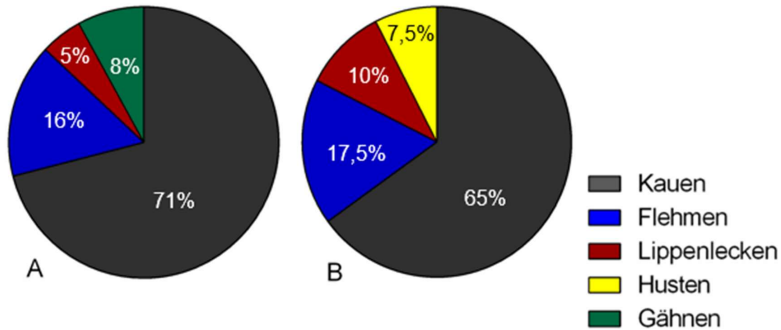


Abb. 26: Unerwünschte Symptome nach TRH-Applikation.

Prozentuale Häufigkeit der einzelnen Symptome am Gesamtscore aller Probanden; A: 1 µg/kg TRH, Gesamtscore: 38 Punkte; B: 2 µg/kg TRH, Gesamtscore: 40 Punkte.

Mit 71 % bei 1 µg TRH bzw. 65 % bei 2 µg TRH war Kauen für beide TRH-Dosierungen das deutlich am häufigsten beobachtete Symptom. Flehmen und Lippenlecken wurden entsprechend seltener festgestellt.

Das Auftreten der unerwünschten Symptome war bei 10 der 11 Probanden (21 von 22 Messungen) auf die ersten 5 Minuten nach TRH-Injektion beschränkt. Proband 5 fiel im Zeitraum von 8 – 9 Minuten nach Stimulation erneut mit dem Symptom Kauen auf, welches mit einem Scorepunkt bewertet wurde.

3.2.11 Einfluss der Fütterung auf die Hormone

Die zur Verfügung gestellte Heuration wurde von allen Probanden innerhalb von 90 – 120 Minuten vollständig aufgenommen.

Statistisch wurden die Hormonkonzentrationen zwischen den Blutentnahmezeitpunkten -120 (Nüchternprobe) und 0 Minuten mittels t-Test für abhängige Stichproben auf der Basis der Mittelwerte aus beiden TRH-Tests verglichen. Ein statistisch signifikanter Einfluss der Fütterung wurde für Insulin und Glukose sowie die Schilddrüsenhormone fT4 und fT3 festgestellt, wobei jeweils ein Konzentrationsanstieg beobachtet wurde. Die Konzentrationen von

ACTH, Cortisol und T4 wurden durch die Futteraufnahme nicht signifikant beeinflusst (Tab. 18).

Tab. 18: Fütterungseinfluss auf die Hormon- und Glukosekonzentration (n = 11).

Variable	Fütterungseffekt
ACTH	n.s
Cortisol	n.s.
Insulin	0,002
Glukose	0,0008
T4	n.s.
fT4	0,01
fT3	0,04

3.2.11.1 Insulin und Glukose

Die Nüchterninsulinwerte aller Probanden befanden sich mit $24,6 \pm 14,0$ pmol/l ($12,9 - 60,3$ pmol/l) im vom Labor als physiologisch angegebenen Bereich ($6,0 - 78,6$ pmol/l), wiesen aber eine recht große Streuung auf. Nach der Heuaufnahme stieg die Insulinkonzentration zwei Stunden nach Fütterung (Basalprobe, Zeitpunkt 0) signifikant an ($p = 0,002$), sodass die Konzentration bei 10 der 11 Probanden um den Faktor $1,6 - 3,3$ oberhalb der Nüchternwerte lag angegebenen (Abb. 27).

Auffällig stellte sich der Insulinverlauf bei Proband 1 dar. Obwohl die Stute die Raufuttermation vollständig innerhalb von 100 Minuten aufgenommen hatte, war ihr niedriger Nüchternwert von $12,9$ pmol/l fast identisch mit ihrer postprandialen Insulinkonzentration von $13,6$ pmol/l (Anstieg lediglich um den Faktor $1,1$).

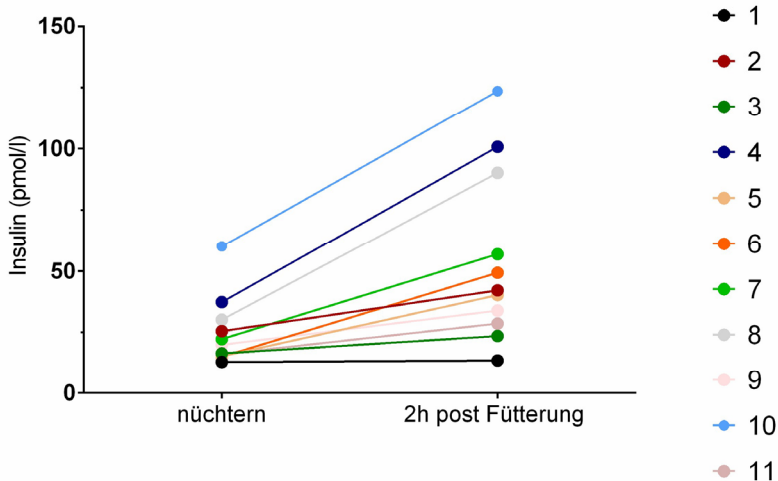


Abb. 27: Insulinkonzentration vor und nach Raufutterraufnahme aller 11 Probanden.

Statistisch signifikanter Anstieg der Insulinkonzentration nach der Fütterung ($p = 0,002$).

Mit $5,3 \pm 0,7$ mmol/l ($4,4 - 6,6$ mmol/l) befand sich bereits der Nüchtern-glukosewert für 5 der 11 Probanden oberhalb des mit $3,1 - 5,1$ mmol/l vom Labor angegebenen Referenzbereichs.

Die Blutglukosekonzentration zeigte nach Fütterung ebenfalls einen statistisch signifikanten Anstieg ($p = 0,0008$), wobei die postprandialen Werte (Basalprobe, Zeitpunkt 0) maximal um den Faktor 1,2 oberhalb der Nüchternwerte lagen (Abb. 28). Mit einem ungewöhnlichen Verlauf fiel Proband 6 auf. Im Vergleich zum Nüchternwert ($6,4$ mmol/l) zeigte sich hier 2 Stunden nach der Fütterung ein Abfall der Glukosekonzentration auf $6,1$ mmol/l. Der Wallach hatte seine Futterration innerhalb von 110 Minuten vollständig aufgenommen.

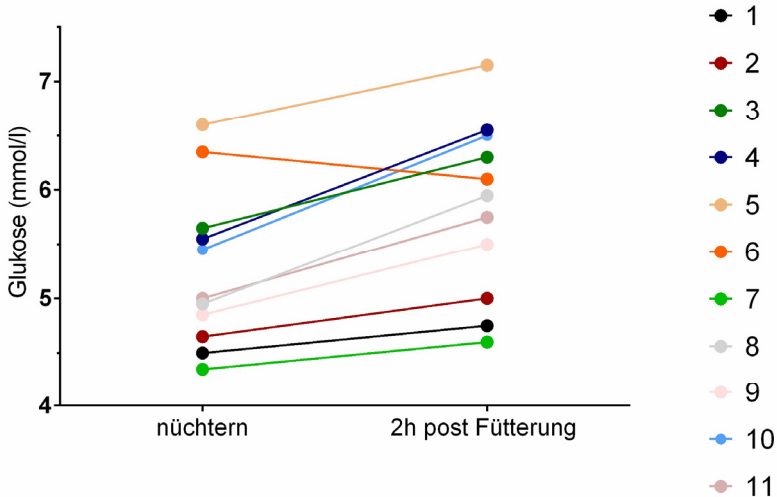


Abb. 28: Glukosekonzentration vor und nach Raufutteraufnahme aller 11 Probanden.

Statistisch signifikanter Anstieg der Glukosekonzentration nach der Fütterung ($p = 0,0008$).

3.2.11.2 Schilddrüsenhormone

Bei den Schilddrüsenhormonen stellte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Nüchternwerten von fT4 und fT3 und jenen zwei Stunden nach Raufuttergabe heraus.

Die Nüchternkonzentrationen von fT4 bei den 11 Probanden befanden sich mit $8,8 \pm 3,1$ ($2,7 - 13,0$) pmol/l teilweise unterhalb des vom Labor angegebenen Referenzbereichs von $6,5 - 20,6$ pmol/l. In Abb. 29 sind die Hormonkonzentrationen vor und zwei Stunden nach der Gabe von Raufutter dargestellt. Abgesehen von Proband 3 und 5, bei denen die postprandiale Konzentration minimal unterhalb der Ausgangskonzentration lag, zeigten die übrigen Probanden einen Anstieg der fT4-Konzentration nach Futteraufnahme (Faktor 1,01 – 1,35). Die Konzentrationen zwei Stunden nach Fütterung lagen dann bei $9,5 \pm 2,9$ ($3,7 - 13,4$) pmol/l.

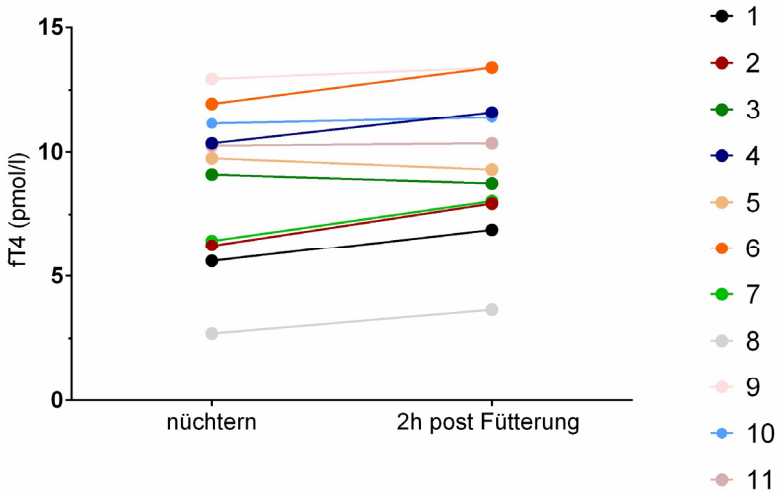


Abb. 29: fT4-Konzentration vor und nach Raufutteraufnahme aller 11 Probanden.

Statistisch signifikanter Anstieg der fT4-Konzentration nach der Fütterung ($p = 0,01$).

Vergleichbar zum fT4 stellten sich auch die Konzentrationen des fT3 vor und nach Fütterung dar (Abb. 30).

Die Nüchternkonzentrationen der 11 Probanden lagen mit $3,7 \pm 0,6$ (2,7 – 4,4) pmol/l relativ dicht beieinander. Angaben bezüglich eines Referenzbereichs werden vom Labor für dieses Hormon nicht gegeben.

Bei 8 von 11 Probanden zeigte sich nach der Fütterung ein Konzentrationsanstieg um den Faktor 1,05 – 1,29. Für die Probanden 5, 9 und 10 wurden jeweils leichte Abfälle der Hormonkonzentration (Faktor 0,91 – 0,96) beobachtet. Zwei Stunden nach Raufuttergabe betrug die fT3-Konzentration $4,0 \pm 0,6$ (3,2 – 5,2) pmol/l.

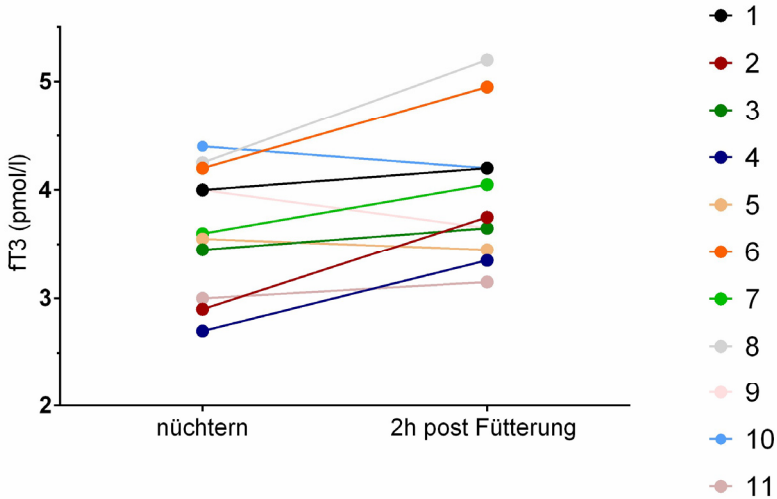


Abb. 30: fT3-Konzentration vor und nach Raufutteraufnahme aller 11 Probanden.

Statistisch signifikanter Anstieg der fT3-Konzentration nach der Fütterung ($p = 0,04$).

Für T4 ergaben sich vor und zwei Stunden nach der Heugabe keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Die nüchtern gemessenen T4-Werte aller elf Probanden betrugen $20,7 \pm 9,7$ (4,5 – 34,8) nmol/l. Dabei lagen die Konzentrationen bei Proband 2, 7 und 8 unterhalb des Referenzbereichs von 12,9 – 45,0 nmol/l. Nach Futteraufnahme war bei zwei Probanden (Nr. 3 und 5 und somit die gleichen, die auch im fT4 einen Abfall zeigten) niedrigere Konzentrationen als im nüchternen Zustand festzustellen. Bei Proband 8 lagen die Konzentrationen sowohl vor als auch nach der Fütterung unterhalb der Bestimmungsgrenze des Labors. Alle übrigen Probanden wiesen fast gleiche Werte bzw. minimal höhere postprandiale Konzentrationen auf.

Den deutlichsten Anstieg (Faktor 1,89) zeigte Proband 1. Dieser zeigte zwei Stunden nach der Fütterung in einem Test 12,3 nmol/l T4, während in dem anderen Test 36,8 nmol/l T4 gemessen wurden. Im Nachhinein ist dieser hohe Wert als Ausreißer anzusehen, da in der darauffolgenden Messung 30 Minuten

nach TRH mit 18,5 nmol/l wieder eine deutlich geringere Konzentration bestimmt wurde und sich von dort an ein plausibler Verlauf, wie er nach TRH-Gabe mit einem Konzentrationsanstieg zu erwarten ist, darstellte. Aufgrund der Mittelwertbildung aus den Konzentrationen beider Tests ergibt sich der ungewöhnliche Anstieg bei Proband 1, wie in Abb. 31 zu sehen ist. Bei den übrigen Probanden war ein Anstieg um den Faktor 1,04 – 1,29 zu verzeichnen. Die Konzentration aller elf Probanden zwei Stunden nach Heufütterung betrug $22,9 \pm 9,7$ (4,5 – 36,2) nmol/l.

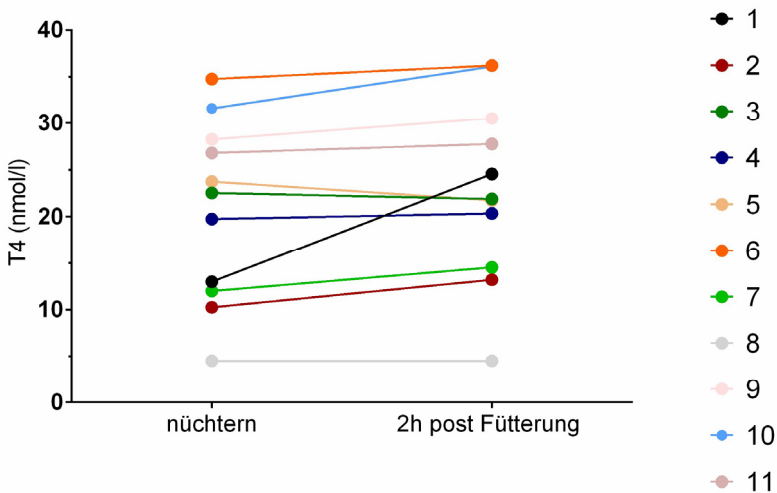


Abb. 31: T4-Konzentration vor und nach Raufutteraufnahme aller 11 Probanden.

T4-Konzentrationen ohne signifikante Unterschiede ($p = 0,07$).

3.2.12 Einfluss von BCS, Tageslichtlänge und Probandenalter auf die Hormonverläufe

Für die Tageslichtlänge sowie das Probandenalter wurden keine signifikanten Korrelationen mit den AUCs der Laborparameter festgestellt. Demgegenüber

waren für den BCS (Tab. 8) signifikante positive Korrelationen sowohl mit der Cortisol AUC als auch mit der Insulin AUC zu beobachten (Tab. 19)

Tab. 19: Zusammenhänge zwischen Body Condition Score und Laborparametern.

Parameter (AUC)	1 µg TRH/kg KGW	2 µg TRH/kg KGW
ACTH ¹	n.s.	n.s.
Cortisol ¹	0,04 r = 0,64	n.s. r = 0,34
Insulin ¹	0,03 r = 0,63	0,04 r = 0,65
Glukose ¹	n.s.	n.s.
T4 ²	n.s.	n.s.
fT4 ²	n.s.	n.s.
fT3 ²	n.s.	n.s.

¹: n = 11 ²: n = 8

Bei der Betrachtung der Insulin AUC in Relation zum Body Condition Score (Abb. 32) zeigten sich nach beiden TRH-Tests signifikant positiv korrelierte Zusammenhänge mit r = 0,63 bzw. 0,65.

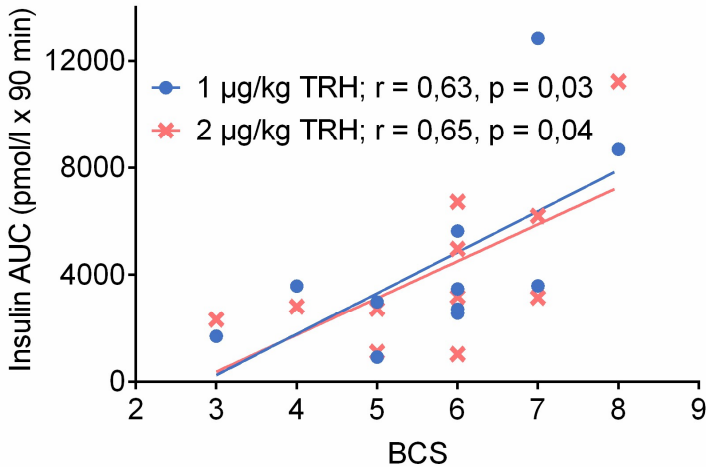


Abb. 32: Korrelation zwischen Insulin AUC und BCS aller 11 Probanden, dargestellt für beide TRH-Dosierungen.

Statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen BCS und Insulin AUC.

Auch für die Messung des Cortisols wurde ein Anstieg der AUC mit zunehmendem BCS beobachtet (Abb. 33). Die Korrelation ($r = 0,64$) wies aber nur bei 1 µg/kg TRH eine statistische Signifikanz auf. Nach Gabe von 2 µg/kg TRH errechnete sich mit $r = 0,34$ ($p = 0,30$) kein signifikanter Zusammenhang.

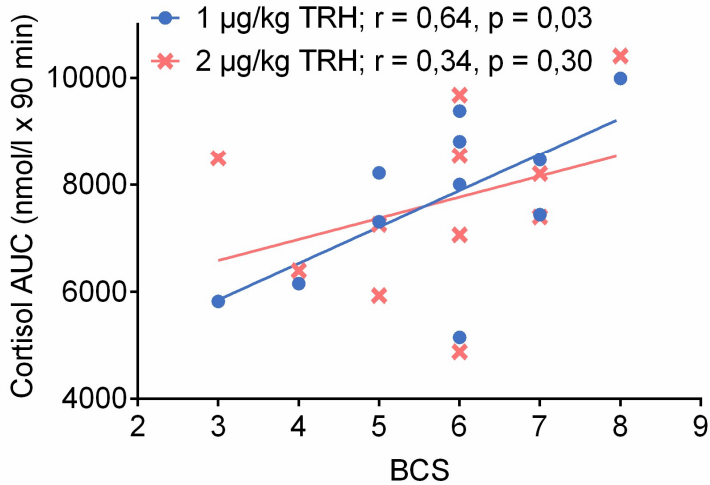


Abb. 33: Korrelation zwischen Cortisol AUC und BCS aller 11 Probanden, dargestellt für beide TRH-Dosierungen.

Statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen BCS und Cortisol AUC nach 1 µg/kg TRH.

4 Diskussion

4.1 Diskussion von Material und Methoden

4.1.1 Diskussion des Studiendesigns

Das Ziel, die zwei TRH-Dosierungen von 1,0 µg/kg bzw. 2,0 µg/kg Körpergewicht im Hinblick auf die durch das Releasinghormon induzierte ACTH-Ausschüttung als Hauptparameter bei gesunden Pferden zu untersuchen wurde mittels einer Studie im cross-over Design verfolgt.

Dieses Studiendesign besitzt den Vorteil, dass die Untersuchung anhand einer verhältnismäßig kleinen Probandenzahl von 11 Pferden durchgeführt werden konnte, da diese intraindividuell verglichen wurden. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass in der biometrischen Planung von einem geringen Fehler 2. Art ($\beta = 0,1$) ausgegangen wurde, sodass die Power der Studie trotz kleiner Probandenzahl dennoch bei 90 % liegt.

Die statistisch intraindividuell erfolgten Vergleiche erlaubten weiterhin die Probennahmen bei den Probanden im Verlauf des gesamten Jahres, obwohl bereits bekannt ist, dass auch in den Ergebnissen von TRH-Stimulationstests im Herbst mit höheren Resultaten zu rechnen ist (Funk et al. 2011). Derartige jahreszeitlich bedingte Einflüsse konnten bei der eigenen Untersuchung aufgrund der kurzen Zeitspanne von maximal 14 Tagen zwischen den beiden Stimulationstests vernachlässigt werden.

Kritisch anzumerken ist, dass die Studie nicht verblindet durchgeführt wurde. Relativiert werden kann diese Tatsache dadurch, dass es sich bei dem Haupt- sowie fast allen Nebenparametern um von einem Labor objektiv bestimmte Hormonkonzentrationen handelt, sodass die Kenntnis der Autorin über die verwendete TRH-Dosis keinen Einfluss auf die erhobenen Ergebnisse besitzen kann. Lediglich für die Erfassung der unerwünschten Symptome wäre ein verblindet durchgeführter Versuchsablauf wünschenswert gewesen, da eine Beeinflussung des notierten Scores aufgrund der Kenntnis der verabreichten TRH Dosis grundsätzlich denkbar ist. Aus personellen Gründen war eine

Verblindung jedoch nicht umsetzbar. Aufgrund der einfach zu erkennenden Symptome und der klar definierten Vorgaben für die Vergabe der Scores anhand des zeitlichen Auftretens war aus Sicht der Autorin dennoch gewährleistet, dass die Punktvergabe objektiv erfolgte.

Die bislang in der Literatur verwendete TRH-Dosis von 1 mg pro Pferd führte in der Planung dieser Studie zu der Ausgangsdosis von 2 µg pro Kilogramm Körpergewicht, die sich rechnerisch aus der Annahme eines Standardpferdes mit 500 kg Körpergewicht ergibt. Die Verwendung dieser Dosis erlaubt einen Vergleich der eigenen Ergebnisse mit den bislang in der Literatur beschriebenen Daten. Aus dem Ziel einer Reduktion der verwendeten TRH-Menge resultierte willkürlich die halbierte Dosis von 1 µg TRH pro Kilogramm Körpergewicht. Nach Kenntnis der Autorin liegen bislang keine vergleichbaren Daten in der Literatur vor.

Da in der eigenen Untersuchung für keinen Parameter ein Reihenfolgeeffekt festgestellt wurde, scheint die gewählte Wash-out-Zeit von mindestens 6 Tagen zwischen beiden Stimulationstests ausreichend lang gewesen zu sein. Weitere Untersuchungen wären erforderlich um die minimal erforderliche Zeit zwischen wiederholt erfolgenden TRH-Tests zu bestimmen. Diesbezüglich konnten Goodale et al. (2015) zeigen, dass eine eintägige Wash-Out-Phase nicht ausreichend lang ist. Bei den im Abstand von 24 Stunden mit jeweils 1 mg TRH pro Pferd (n = 30) durchgeführten TRH-Stimulationstests lagen die ACTH-Konzentrationen des zweiten Stimulationstests immer unterhalb jener der ersten Testung. Laut Kenntnis der Autorin gibt es bislang keine weiteren Untersuchungen, die den Zeitraum zwischen 24 Stunden und 6 Tagen weiter eingrenzen.

Das für die Untersuchung verwendete TRH wurde in Form eines in der Humanmedizin zugelassenen Fertigproduktes gegeben. Im Vergleich dazu wird in der Literatur, in Ermangelung eines Fertigarzneimittels v.a. im amerikanischen Raum, meist TRH eingesetzt, welches als Pulver zur Verfügung steht. Vor Verwendung muss dieses in Lösung gebracht sowie anschließend aliquotiert und

tiefgefroren aufbewahrt werden. Obwohl das TRH in beiden Fällen chemisch identisch ist, ist aufgrund der unterschiedlichen Formulierungen prinzipiell vorstellbar, dass unterschiedliche ACTH-Antworten im Organismus hervorgerufen werden. Hierzu führten Goodale et al. (2015) Untersuchungen durch, in denen sie ein Fertigprodukt mit einer selbst hergestellten TRH-Lösung hinsichtlich der jeweiligen ACTH-Antwort verglichen, indem sie bei 30 Pferden zwei TRH-Stimulationstests im Abstand von 14 Tagen durchführten. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede gezeigt. Demzufolge können die Ergebnisse der eigenen Probanden (nach Stimulation mit einem TRH-Fertigprodukt) gut mit den in der Literatur beschriebenen Daten, in denen ganz überwiegend selbst hergestellte TRH-Lösungen verwendet werden, verglichen werden.

4.1.2 Diskussion der Studiendurchführung

Die in der eigenen Untersuchung bestimmten Parameter (v.a. ACTH und Cortisol) werden über die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebenniere-Achse leicht beeinflusst. Dies wurde in mehreren Aspekten bei der Versuchsplanung berücksichtigt. Aufgrund von möglichen Cortisolanstiegen infolge sexueller Erregung (Colborn et al. 1991) wurden Hengste von vornherein von der Untersuchung ausgeschlossen, da solche Situationen aufgrund der räumlichen Bedingungen und des parallel ablaufenden Klinikbetriebs nicht hätten ausgeschlossen werden können. Die ausführliche Voruntersuchung diente insbesondere dazu einen akzeptablen Gesundheitszustand sicherzustellen. Insbesondere Krankheiten wie Rehe oder Muskelentzündungen (Hoffsis et al. 1970, Ayala et al. 2012) sowie chronische Entzündungsprozesse (Mills et al. 1997) hätten über Schmerz und Stress zur Veränderung der oben genannten Hormone führen und somit die Untersuchungsergebnisse verfälschen können. Weiterhin wurde während der Voruntersuchung ein Eindruck von den jeweiligen Probanden gewonnen, wie diese auf das Handling und vor allem die Blutprobenentnahme reagierten. Wenngleich Fouché et al. (2015) zeigen konnten, dass eine Venenpunktion und die damit einhergehende äußerlich

wahrnehmbare Stressreaktion am Pferd keinen Einfluss auf die ACTH-Konzentration haben, wurde infolge der Voruntersuchungen eine Stute von der eigenen Studie ausgeschlossen. Sie zeigte sich bereits im generellen Umgang unkooperativ und reagierte mit deutlichen Stressanzeichen auf die Blutprobenentnahme.

Durch ihren Ausschluss sollte die Gefahr der Beeinflussung der Hormonkonzentrationen durch andere Faktoren als der TRH-Stimulation minimiert und somit ein möglichst reibungsloser Versuchsablauf sichergestellt werden.

Bei allen Pferden, die in die Studie eingeschlossen wurden, verlief die Durchführung der Stimulationstests sowie Placeboversuche problemlos. Die fünf Pferde, die für die Testdurchführung in die Klinikgebäude transportiert wurden, zeigten zu Beginn der Aufstallung leichte Nervosität. Diese legte sich innerhalb kurzer Zeit, sodass die Pferde 1 – 2 Stunden nach der Ankunft und für den restlichen Aufenthalt keine äußerlich wahrnehmbaren Stressreaktionen zeigten. Die Arbeitsgruppe von Baucus konnte 1990 zeigen, dass allein Transporte zu Stressreaktionen, die über erhöhte Cortisolkonzentrationen im Blut nachweisbar sind, führen. Dennoch muss in der eigenen Untersuchung nicht von einer Beeinflussung der Testergebnisse ausgegangen werden, da sich die Transportdauer mit maximal 25 Minuten Fahrt deutlich von jener in der Untersuchung von Baucus et al. (1990) unterschied, in der die Tiere 792 km über 12 Stunden transportiert wurden. Noch dazu lag zwischen der Einstellung der eigenen Probanden und Beginn der Stimulationstests ein Zeitraum von mindestens 15 Stunden, sodass eine Auswirkung des Transports auf die Versuchsergebnisse als sehr unwahrscheinlich anzusehen ist.

An den Testtagen verliefen alle Abläufe problemlos. Lediglich für das Legen des Venenverweilkatheters wurde eine Hilfsperson benötigt, das weitere Vorgehen inklusive der Blutprobenentnahmen war dann gut allein durchführbar.

Im Zusammenhang mit der Testdurchführung wurden keine Komplikationen beobachtet. Insbesondere traten auch keine Thrombophlebitiden auf, wie sie nach dem Legen von intravenösen Kathetern bei equinen Patienten recht häufig beobachtet werden (Schoster 2017).

Alle Probanden konnten innerhalb des vorgegebenen maximalen Zeitraums von 6 Wochen vollständig untersucht werden, Dropouts wurden nicht verzeichnet.

Als zu kritisierender Aspekt müssen die bei den ersten drei Probanden zu kurzen Probenentnahmezeiträume angesprochen werden. Diese betrugen initial lediglich 240 Minuten nach Stimulation, was sich für die Auswertung der Schilddrüsenhormone als zu kurz erwies, sodass die Werte von Proband 1 – 3 für die statistische Auswertung der Schilddrüsenhormon AUCs nicht verwendet werden konnten. Für den Hauptzielparameter ACTH sowie Cortisol, Insulin und Glukose hingegen lagen alle Datensätze vollständig vor.

Für den Gebrauch des TRH-Stimulationstests als Diagnostikum in der Praxis muss dieser mit deutlich weniger Probenahmen auskommen. Die zahlreichen Probenentnahmen in der eigenen Studie dienten aber dazu möglichst genaue Konzentrationsverläufe der Hormone bei gesunden Probanden zu bestimmen. Diese sollen als Basis für Vergleiche mit PPID Patienten dienen, um daraufhin möglichst wenige und optimale Zeitpunkte für die Differenzierung zwischen gesunden und kranken Tieren festlegen zu können. Bislang sind v.a. die Zeitpunkte 10 und 30 Minuten nach TRH-Stimulation für Cutoff Werte zur PPID-Diagnostik in der Diskussion (Beech et al. 2007, Durham et al. 2014, Equine Endocrinology Group 2019).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Diskussion der Probandenauswahl

Bei Betrachtung der Probandendaten zeigt sich eine breite Verteilung zwischen fünf Rassen und im Alter (7 – 27 Jahre). Weiterhin fällt ins Auge, dass hauptsächlich Stuten und nur 2 Wallache für die eigene Untersuchung genutzt wurden, sodass die Frage aufkommt, ob diese Stichprobe als geeignet anzusehen ist.

Hauptziel der eigenen Untersuchung war es, die beiden TRH-Dosierungen hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf im peripheren Blut messbare Hormone,

insbesondere das ACTH, intraindividuell zu vergleichen. Die zuvor genannten Aspekte spielen daher für die eigenen Auswertungen keine Rolle. Inwiefern die Ergebnisse auf Hengste übertragbar sind bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Fünf der eigenen Probanden waren im Vorfeld mit von der Norm abweichenden Befunden in der klinischen Untersuchung aufgefallen (Kapitel 3.2.2). Gleichwohl wurden diese Pferde als „gesund“ in die Studie eingeschlossen, was kritisch zu beleuchten ist.

Zwei dieser Tiere fielen mit Hautveränderungen auf, wobei ein Einfluss auf die Testergebnisse aus Sicht der Autorin als überaus unwahrscheinlich beurteilt wurde. Zwar können sich chronische Entzündungsgeschehen auf die Cortisolkonzentrationen auswirken (Mills et al. 1997), jedoch waren die Maukeveränderungen bei Proband 3 derart gering ausgeprägt, dass dies für diesen Fall ausgeschlossen wurde. Gleiches gilt auch für die großflächige Narbe bei Proband 1, da die zugrundeliegende Verbrennung bereits viele Jahre zurück lag.

Die übrigen drei Pferde zeigten kardiale Auffälligkeiten, wie sie bei Pferden aller Nutzungsrichtungen regelmäßig vorkommen (Reef et al. 2014). Häufig handelt es sich aufgrund des ungestörten Allgemeinbefindens und anhaltender Leistungsbereitschaft um Zufallsbefunde. Daher wurde es als extrem unwahrscheinlich angesehen, dass die Ergebnisse der Stimulationstests durch die kardialen Befunde beeinflusst wurden.

Da der TRH-Stimulationstest als Diagnostikum einer PPID Einsatz finden soll wäre eine zur Risikogruppe möglichst gut vergleichbare Probandenpopulation wünschenswert. Im Folgenden wird diskutiert ob beziehungsweise in welchen Aspekten die eigenen Probanden vergleichbar mit potentiell für eine PPID-Diagnostik anstehenden Pferden sind.

Klinische Auffälligkeiten wie sie in der Voruntersuchung festgestellt wurden sind in der Pferdepopulation sehr verbreitet. Im praktischen Einsatz des TRH-Stimulationstests als Diagnostikum werden dementsprechend ebenfalls solche

Pferde vorkommen, sodass die Probandenauswahl diesen Aspekt betreffend eine gute Stichprobe der Population darstellt.

Hinsichtlich des Alters berichten Beech et al. (2007) von einem deutlich erhöhten Risiko für eine PPID bei mittelalten und alten Pferden. McGowan et al. (2013) geben die Prävalenz für Pferde ab 15 Jahren mit 21 % an und weisen auf einen weiteren Anstieg mit zunehmendem Alter hin. Sechs der eigenen Probanden fallen mit 14 Jahren oder darüber in oder unmittelbar vor dieses Risikoalter. Daher würden sie sich gut eignen, um mit Resultaten PPID erkrankter Tiere ähnlichen Alters verglichen zu werden. Die übrigen, deutlich jüngeren fünf Probanden weisen mit 7 bis 11 Jahren ein Alter auf, in dem es nur wenige erkrankte Tiere geben wird. Zwar verweist Schott (2002) auf zwei Quellen, in denen jeweils 7-jährige Stuten an PPID erkrankt waren, vertritt aber die Meinung, dass der PPID-Diagnostik bei Pferden unter 10 Jahren selten nachgegangen werden sollte, sofern nicht das Symptom des Hirsutismus vorliegt. Wäre der Zweck der eigenen Untersuchung ein Vergleich der TRH-Stimulationstests zwischen Gesunden und PPID-Kranken gewesen, so wäre der Einschluss weiterer älterer Tiere in die Studie wünschenswert gewesen. Da die These dieser Arbeit darin bestand, dass die niedrigere TRH-Dosierung zu einer veränderten ACTH-Ausschüttung im intraindividuellen Vergleich führt, kam es durch den Einschluss der jüngeren Pferde zu keiner verminderten Aussagekraft der eigenen Ergebnisse.

Für mehrere Spezies, beispielsweise den Hund (Rothuizen et al. 1993), sind physiologischerweise höhere ACTH-Konzentrationen bei älteren Tieren bekannt – Donaldson et al. (2005) diskutieren diesen Aspekt auch für das Pferd. Die Autoren untersuchten aus zwei Herden insgesamt 39 Pferde und Ponies mit einem medianen Alter von 5 (2 – 25) Jahren (n = 29) bzw. 15 (8 – 26) Jahren (n = 10) in den Monaten Januar, Mai und September. Sie fanden sowohl im Januar wie auch im September signifikante, positive Korrelationen zwischen dem Probandenalter und der ACTH-Konzentration (Donaldson et al. 2005). Vor diesem Hintergrund wäre von Interesse, ob die Resultate des TRH-Stimulationstests ebenfalls eine Altersabhängigkeit, unabhängig von einer PPID, aufweisen. Hierzu kann aufgrund des dafür deutlich zu geringen

Probandenumfangs in der eigenen Untersuchung keine Aussage getroffen werden, sodass in der Zukunft weitere Untersuchungen diesbezüglich erfolgen sollten.

Da PPID bei allen Pferderassen auftritt (Schott 2002) spiegeln die eigenen Probanden diesbezüglich eine gute Auswahl wider. Obwohl mehrere v.a. ältere Studien den Anschein erwecken, dass Ponys häufiger betroffen sind (van der Kolk et al. 1993, Hillyer et al. 1992, Love 1993) wurde die Rasse als Risikofaktor nur in einer Untersuchung erfasst. McGowan et al. (2013) prüften dazu 325 Equiden, von denen 69 an PPID erkrankt waren und stellten keinen Unterschied in der Prävalenz zwischen Ponys und Pferden fest.

Auch bezüglich des Geschlechts gibt es Studien mit unterschiedlichen Aussagen. Während die Daten teilweise den Eindruck hervorrufen, dass Stuten gegenüber Wallachen und Hengsten ein erhöhtes Risiko aufweisen an PPID zu erkranken (Heinrichs et al. 1990, Boujon et al. 1993), deuten die Untersuchungen von Hillyer et al. (1992), van der Kolk et al. (1993), sowie Pongratz et al. (2010) auf einen größeren Anteil männlicher Tiere unter den PPID-Erkrankten hin. Hingegen konnten Miller et al. (2016) in einer größeren postmortalen Untersuchung geriatrischer Patienten keinen Zusammenhang zwischen Geschlecht und Häufigkeit einer PPID feststellen. Von den insgesamt 241 von ihnen untersuchten Pferden fielen 65 Tiere mit einer adenomatösen Hyperplasie (n= 25) oder einem Adenom (n = 40) im Bereich der Pars intermedia der Hypophyse auf. Die Verteilung zwischen den Geschlechtern war dabei mit 34 Stuten und 30 Wallachen sehr gleichmäßig. Unter den histologisch auffälligen Tieren war lediglich ein Hengst vorhanden, was mit der deutlich selteneren Hengsthaltung im Probandengut erklärbar sein dürfte.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch die Arbeitsgruppe um McGowan (2013), die mittels univariabler Regression das Geschlecht als Risikofaktor einer PPID untersuchte und keinen statistisch signifikanten Unterschied feststellen konnte. Daher scheint es unerheblich, dass in der eigenen Untersuchung mehr weibliche als männliche Tiere genutzt wurden.

Zusammenfassend lässt sich folglich feststellen, dass die von der Autorin untersuchten Pferde, abgesehen von den fünf etwas zu jungen Tieren auch eine gute Auswahl im Hinblick auf einen Vergleich mit an PPID Erkrankten darstellen.

4.2.2 Diskussion der NaCl-Kontrolltests

Im Versuchsablauf fanden bei vier Probanden Placebountersuchungen statt. Sinn der Kontrolle war es festzustellen, ob hormonelle Schwankungen im Untersuchungszeitraum, also zwischen in etwa 6:00 bis 15:00 Uhr, unabhängig vom TRH auftreten. Da nicht davon ausgegangen wurde, dass nach Placebo Effekte in einer Größenordnung wie nach TRH auftreten, wurde aus Kostengründen sowie aus ethischen Überlegungen darauf verzichtet, alle Tiere einer Kontrolluntersuchung zu unterziehen. Die verwendeten vier Kontrolltiere wurden beliebig von der Autorin ausgewählt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Placebogaben wie erwartet kaum und keine einheitlichen Effekte auf die Hormonverläufe hatten. Die wenigen Auffälligkeiten in den Kurvenverläufen werden im Folgenden diskutiert. Auf eine statistische Auswertung wurde aufgrund der lediglich vier Kontrollmessungen verzichtet.

Proband 4 zeigte sein ACTH-Maximum nach Placebogabe sowie nach Stimulation mit Verum zum Zeitpunkt 5 Minuten (Abb. 4), wobei der Wert nach Placebo nur 5 pg/ml oberhalb der basalen Konzentration lag. Die jeweiligen Anstiege dieses Probanden nach TRH-Stimulation lagen für 2 und 1 µg/kg TRH mit 34 bzw. 28 pg/ml deutlich höher. Wie von Beech et al. (2007) gezeigt wurde, treten Schwankungen der basalen ACTH-Konzentrationen auch ohne Stimulation auf. Von der Arbeitsgruppe wurde bei 29 klinisch gesunden Pferden zweimal ACTH im Abstand von fünf Minuten bestimmt und dabei Schwankungen von bis zu 6 pg/ml festgestellt. Der Peak bei dem eigenen Probanden Nr. 4 sollte daher nicht als Folge der verabreichten Natriumchloridlösung betrachtet werden, sondern kann als physiologische oder messbedingte individuelle Variation angesehen werden.

Um den Verlauf der Cortisolkonzentration von Proband 4 nach Placebo (Abb. 5) zu erklären, der dem mittleren Verlauf der TRH-stimulierten Tiere (Abb. 19) entsprach, gibt es verschiedene Ansätze. Grundsätzlich muss an eine mögliche Kontamination des Placebos mit Verum gedacht werden. Da am entsprechenden Tag kein weiteres Tier getestet wurde, kann dies mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Zudem wäre in diesem Fall eine höhere ACTH-Konzentration zu erwarten gewesen. Weiterhin kommen generell Stressreaktionen, z.B. durch Legen des Venenverweilkatheters, die fehlende Fütterung oder die zahlreichen Probenentnahmen infrage. Fraglich erscheint hier warum nur eines der Kontrollpferde derartige Stressreaktionen (ohne vorherigen deutlichen ACTH-Anstieg) gezeigt haben soll, während die Cortisolkonzentrationen der anderen Probanden auf basalem Niveau blieben. Überdies zeigte der Proband keine äußerlich erkennbaren Anzeichen für ein gestresstes Verhalten. Es bleibt somit unklar, wodurch der Anstieg des Cortisols nach 30 Minuten auf immerhin 117 nmol/l bei Proband 4 hervorgerufen wurde.

Von den vier Kontrolltieren (1, 2, 4, 11) lagen die Konzentrationen der Schilddrüsenhormone für die Probanden 1 und 2 lediglich bis 240 Minuten nach Placeboinjektion vor, da die Versuchsdauer erst ab Proband 4 verlängert wurde. Somit muss als negativer Aspekt angemerkt werden, dass nur für zwei Kontrollpferde die kompletten Daten der Schilddrüsenhormone vorliegen. Beachtung sollte allerdings finden, dass alle Schilddrüsenhormone 240 Minuten nach Stimulation mit TRH bereits einen deutlichen Anstieg zeigten, für das fT3 das Maximum sogar schon erreicht war (Abb. 25). Folglich eignen sich auch die unvollständigen Daten von Proband 1 und 2 für einen Vergleich zwischen Placebo und Verum.

Die maximale fT3-Konzentration von Proband 11 wurde 60 Minuten nach Gabe des Placebos festgestellt und entspricht damit grundsätzlich dem Verlauf, wie er auch nach der TRH-Stimulation mit 1 µg/kg TRH bei diesem Probanden beobachtet wurde. Der Maximalwert nach TRH lag mit 10,6 pmol/l aber fast doppelt so hoch wie nach Gabe des Placebos. Es ist demnach davon auszugehen, dass der Maximalwert zufällig zeitgleich wie nach TRH-Stimulation

festgestellt wurde und auf individuellen Schwankungen der basalen Konzentrationen beruht. Gleiches gilt für die fT3-Konzentration von Proband 4 nach 300 Minuten, die in der graphischen Darstellung (Abb. 7) ebenfalls ins Auge fällt.

4.2.3 Diskussion der ACTH-Ergebnisse

Die Arbeitshypothese, dass mit 2 µg/kg TRH eine höhere ACTH-Stimulation erzielt werden könne als mit 1 µg/kg TRH, wurde in der eigenen Untersuchung nicht bestätigt: es waren zwischen den TRH-Dosierungen keine statistisch signifikanten Unterschiede der ACTH AUCs bei den klinisch unauffälligen Pferden zu beobachten. Somit ist bereits die niedrigere Dosis von 1 µg/kg TRH ausreichend, um durch Ankopplung an die TRH-Rezeptoren der Hypophyse (McFarlane et al. 2006) eine maximale ACTH-Ausschüttung bei den gesunden Equiden hervorzurufen. Mit dieser Erkenntnis stellt sich die Frage, ob eine noch geringere Dosis die maximale Stimulation erzielen könnte bzw. ob sich über eine weitere Dosisminimierung das Auftreten unerwünschter Symptome reduzieren ließe.

Bislang gibt es keinerlei Untersuchungen zu unterschiedlichen TRH-Dosen bzw. gewichtsbezogenen Dosierungen des TRH und deren Auswirkung auf die ACTH-Ausschüttung aus der Hypophyse, sodass in Zukunft hierzu weitere Studien sinnvoll erscheinen.

Im Hinblick auf den Einsatz des TRH-Stimulationstest in der Routinediagnostik spielen auch finanzielle Aspekte eine Rolle. Gegenüber den zurzeit standardmäßig eingesetzten Verfahren zur Diagnostik einer PPID (basales ACTH, DST) ist der TRH-Test, bedingt durch die hohen Arzneimittelkosten für das TRH-Ferring®, verhältnismäßig teuer. Die derzeitigen (2020) Kosten für die jeweiligen Tests können der Tab. 20 entnommen werden. Diese basieren auf dem einfachen Satz der aktuell (2019) geltenden Gebührenordnung für Tierärzte (GOT), der Apothekenverkaufspreise der Arzneimittel, die für ein Pferd mit 500 kg Körpergewicht benötigt werden und der aktuell geltenden Preise des Untersuchungslabors Biocontrol (Bioscientia, Institut für medizinische Diagnostik

GmbH, Ingelheim), die telefonisch erfragt wurden. Anfahrtskosten für die jeweiligen Besuche, sowie die klinische Untersuchung sind in der Rechnung nicht berücksichtigt. Während die Messung des basalen ACTH und der TRH-Stimulationstest bei einem Besuch möglich sind, muss beim DST auch die zweimalige Anfahrt berücksichtigt werden. Als tierärztliche Leistungen gingen bei Bestimmung des basalen ACTH lediglich eine venöse Blutentnahme, beim DST zwei venöse Blutentnahmen sowie eine intramuskuläre Injektion und beim TRH eine intravenöse Injektion sowie zwei venöse Blutentnahmen 10 und 30 Minuten nach TRH ein.

Tab. 20: Vergleich der derzeitigen (2020) Kosten verschiedener Labortests zur Diagnostik einer PPID.

	Basales ACTH	DST	TRH-Test (2 µg/kg TRH)
Leistung (GOT)	6,41	18,59	20,53
Arzneimittel	–	0,98	62,78
Labordiagnostik	28,70	35,00	49,00
Gesamt* (Euro)	35,11	54,57	132,31

*zzgl. Mehrwertsteuer

Über eine Reduktion der Kosten für das TRH sowie eventuell auch die Festlegung auf einen ACTH-Analysezeitpunkt, also entweder 10 oder 30 Minuten post TRH könnte der Test im Vergleich zu den anderen Diagnostika wettbewerbsfähiger werden.

Der zeitliche Verlauf der ACTH-Konzentration mit Maxima bei der ersten Probennahme 5 Minuten nach Stimulation mit TRH zeigte sich bei allen Probanden sehr ähnlich, wobei die erreichten Konzentrationen deutliche interindividuelle Unterschiede aufwiesen (Kapitel 3.2.5). Somit decken sich die eigenen Resultate mit Untersuchungen von Beech et al. (2007). Mittels sehr engmaschiger Blutprobenentnahmen (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 30, 60, 180 Min.) nach TRH-Injektion zeigte diese Arbeitsgruppe, dass bei allen Probanden (44

Pferde und 4 Ponys) die Maximalwerte von 61 Stimulationstests nach 2 (9 Probanden), 4 (37 Probanden) oder 6 (15 Probanden) Minuten auftraten. Aufgrund der reduzierten Entnahmezeitpunkte zu Beginn der eigenen Untersuchung (0, 5, 10, 15 Min) bündeln sich die ACTH-Maxima der elf eigenen Probanden bei 5 Minuten.

Hingegen wurden in der Studie von Funk et al. (2011) die ACTH-Maximalwerte erst 10 – 30 Minuten nach TRH-Injektion erreicht. Untersucht wurden von dieser Arbeitsgruppe 9 klinisch gesunde Probanden, die mit 1 mg TRH pro Pferd stimuliert wurden. Die ACTH-Konzentrationen wurden nach 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60 und 180 Minuten bestimmt. Es bleibt unklar, wodurch die späteren Zeitpunkte der Maximalwerte hervorgerufen wurden. Auffällig waren die vergleichsweise niedrigen absoluten Maximalwerte bei den von Funk et al. (2011) verwendeten Probanden. Obwohl die Stimulationstests vergleichbar zur eigenen Untersuchung in unterschiedlichen Monaten, darunter auch im Herbst, für den stärkere ACTH-Antworten auf TRH bekannt sind (Durham et al. 2014), durchgeführt wurden, wurden in 46 von 54 Stimulationstests (85 %) Maxima < 35 pg/ml erzielt.

In der eigenen Untersuchung zeigte sich dies trotz vergleichbarer Einschlusskriterien nur in 2 von 22 Stimulationstests (9 %). Bei diesen beiden eigenen Probanden wurden auch die relativ niedrigen Maximalwerte bereits nach 5 Minuten gemessen. Denkbar ist, dass die insgesamt gering stimulierten ACTH-Werte der in Alabama durchgeführten Studie von Funk et al. (2011) keine eindeutigen Peaks hervorbringen, was die unterschiedlichen Zeitpunkte des Auftretens der Maxima erklären könnte.

Zeitliche Angaben zur Rückkehr der ACTH-Werte bei gesunden Probanden auf ihr basales Niveau beschreiben mit 45 Minuten post TRH nach Kenntnis der Autorin nur Funk et al. (2011). Bei den eigenen Probanden war dieser Zeitraum mit 30 – 90 Minuten länger. Von Beech et al. (2007) werden 1 – 3 Stunden angegeben, wobei neben klinisch gesunden Tieren auch an PPID erkrankte Pferde in diese Studie eingeschlossen waren. Die stark differierenden Angaben könnten durch unterschiedlich hohe prozentuale Anstiege des ACTH bis zum

Maximum, die jeweilige Jahreszeit oder auch die Galenik der jeweiligen TRH-Lösung bedingt sein.

Zwischen den eigenen Probanden variierten die absoluten maximalen ACTH-Konzentrationen, die durch Stimulation mit TRH erzielt wurden erheblich. Trotz des auf das jeweilige Körpergewicht abgestimmten dosierten TRH wurden zwischen den Basalwerten und dem Wert nach 10 Minuten stark unterschiedliche prozentuale ACTH-Anstiege von 82 bis 825 % beobachtet. Diese stehen im deutlichen Gegensatz zu den von Funk et al. (2011) für gesunde Pferde beschriebenen Anstiegen um 44 – 92 % bzw. um 61 – 133 %, wie sie aus den Daten von Beech et al. (2007) durch die Autorin nachträglich berechnet wurden. Anstiege in solch geringen Größenordnungen konnten in der eigenen Untersuchung lediglich für Proband 3 und 11 festgestellt werden (82 und 131 %). Deutlich höhere prozentuale Anstiege – von Funk et al. (2011) mit 619 – 890 % angegeben – werden als typisch für an PPID erkrankte Tiere angesehen. Sechs der eigenen Probanden (1, 2, 6, 7, 8, 9) fielen zumindest in einer der beiden TRH-Stimulationstests mit vergleichbaren Werten auf (Anstiege um 692 – 825 %). Die übrigen Probanden 4, 5 und 10 zeigten Anstiege um 146 – 221 %.

Werden die eigenen Ergebnisse anhand bestehender Cutoffs (Tab. 11) beurteilt, so müssten 6 der als gesund in die eigene Untersuchung eingeschlossenen 11 Probanden aufgrund mindestens einem Testdurchlauf als PPID krank angesprochen werden (Beech et al. 2007, Durham et al. 2014). Die Probanden 2, 6 und 9 zeigten nach TRH-Stimulation in beiden Testdurchläufen Ergebnisse über den vorgeschlagenen Cutoff-Werten, während die Probanden 1, 7 und 8 einmal mit angeblich für Gesunde zu hohen Testergebnissen auffielen. Es stellt sich die Frage, wie diese Diskrepanzen zwischen den Einschlusskriterien und den publizierten Cutoffs, die nach heutigem Wissensstand auf eine PPID hinweisen zu erklären sind.

Durch die Voruntersuchungen wurde der Gesundheitszustand der in die Studie eingeschlossenen Probanden, vor allem im Hinblick auf den Ausschluss einer PPID, bestmöglich erfasst. Neben einer unauffälligen klinischen Untersuchung sollten mittels labordiagnostischer Tests (physiologisches basales ACTH und

negativer DST bei Probanden ≥ 15 Jahre alt) subklinisch betroffene Pferde detektiert werden. Dennoch ist bei diesem Vorgehen nicht vollständig auszuschließen, dass die Pferde bereits Veränderungen im Bereich der Pars intermedia aufweisen. So fanden Beech et al. (2007) bei 14 von 24 klinisch unauffälligen Pferden histologische Veränderungen (Hyperplasie) im Bereich der Pars intermedia der Hypophyse. Vier von diesen Tieren fielen nach TRH-Stimulation im Vergleich zu Pferden ohne histologische Auffälligkeiten mit deutlich höheren Peaks (200 – 500 pg/ml) auf. Trotz der histologischen Auffälligkeiten zeigten diese klinisch unauffälligen Tiere in 9 von 14 Tests basale ACTH-Werte < 35 pg/ml und in 7 von 12 DSTs physiologische Reaktionen.

Fünf eigene Probanden (1, 6, 7, 8, 9) zeigten ähnlich hohe ACTH-Peaks. Da aus ethischen Gründen die Tötung dieser Pferde zur weiteren Abklärung nicht in Frage kam und daher keine Histologie vorliegt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die erhöhten Reaktionen auf bereits bestehende Hyperplasien der Pars intermedia zurückzuführen sind.

Da der TRH-Stimulationstest zudem vor allem als Frühdiagnostikum propagiert wird (Diez de Castro et al. 2014), wäre es also möglich, dass die positiv getesteten eigenen Probanden tatsächlich – wenngleich bislang klinisch und labordiagnostisch sonst nicht auffällig – bereits eine Dysfunktion ihrer Hypophyse aufweisen. Es war also zu prüfen, ob die Pferde im weiteren Verlauf eine klinisch manifeste bzw. durch basales ACTH oder DST zu diagnostizierende PPID entwickeln. Daher wurden die eigenen Probanden größtenteils durch persönliche Untersuchung ($n = 8$) und teils über telefonischen Kontakt ($n = 3$) bis September 2018 begleitet.

Ein bei Durchführung der beiden Stimulationstests sowohl nach 10 als auch 30 Minuten deutlich über den Cutoff-Werten liegender 14-jähriger Ponywallach (Proband 6) fiel bereits im Frühjahr 2017, circa 10 Monate nach Durchführung der Stimulationstests, mit schlechtem Fellwechsel bzw. generell recht langem Sommerfell auf. Daraufhin ließen die Besitzer im September 2017, 15 Monate nach Durchführung der TRH-Tests, das basale ACTH bestimmen. Es lag mit 226 pg/ml deutlich oberhalb des Referenzbereichs, sodass der Wallach seither mit

täglich einer Tablette Prascend® (Wirkstoff: Pergolid, 1 mg Tablette) therapiert wird, worunter sich die Symptomatik laut Besitzerin etwas besserte.

Von den übrigen Probanden zeigte bis September 2018 (minimal 21 Monate nach Studienende) kein Pferd klinische Auffälligkeiten, die für eine PPID sprechen. Bei diesen 10 Pferden konnte im September 2018 eine erneute Untersuchung des basalen ACTH vorgenommen werden. Auf diesem Weg fiel auch Proband 2, eine bei Studiendurchführung 27 Jahre alte Warmblutstute, als PPID-verdächtig auf (ACTH: 70 pg/ml). Die Testergebnisse der übrigen Probanden lagen innerhalb des Referenzbereichs von 10 – 55 pg/ml.

Die erneute Untersuchung erlaubte die Diagnose PPID bei Proband 6 (klinisch und labordiagnostisch) und Proband 2 (labordiagnostisch) 15 und 33 Monate nach den initialen TRH-Stimulationstests. Dabei handelt es sich um zwei der drei Probanden, die in beiden Stimulationstests bei Beurteilung hinsichtlich der Cutoffs mit pathologischen Werten auffällig geworden waren. Der dritte Proband (Proband 9) zeigte auch 23 Monate nach seinen auffälligen Stimulationstests einen physiologischen basalen ACTH-Wert. Kritisch muss hier angemerkt werden, dass die Stimulationstests bei dieser Stute im Oktober durchgeführt wurden. Die ACTH-Konzentrationen post TRH zeigen, wie auch das basale ACTH, jahreszeitliche Unterschiede (Beech et al. 2007). Aufgrund deutlich höherer Werte in den Herbstmonaten raten Durham et al. (2014) davon ab Resultate aus diesem Zeitraum anhand der bestehenden Cutoffs zu bewerten. Da das Ziel der eigenen Untersuchung im intraindividuellen Vergleich bestand, war der Herbst als Testzeitraum nicht ausgeschlossen worden. Exkludiert man im Nachhinein allerdings Proband 9 von der Beurteilung bleiben zwei Probanden, die in beiden Stimulationstests pathologische Resultate zeigten und jeweils in der Nachuntersuchung mit basalen ACTH-Werten oberhalb des Referenzbereichs auffielen.

Erstmals belegen die Resultate dieser Probanden die These, dass der TRH-Stimulationstest eine frühere PPID-Diagnose zulässt als das basale ACTH und noch bevor klinische Symptome beim Pferd auffällig sind. Allerdings zeigten drei andere eigene Probanden trotz Werten, die in einem Stimulationstest oberhalb der vorgeschlagenen Cutoffs lagen nach mindestens 26 Monaten keine

klinischen Veränderungen oder basal erhöhte ACTH-Werte. Daher sind künftig weitere Studien mit einer größeren Probandenzahl und langfristigen Nachverfolgungen notwendig um die Eignung des TRH-Stimulationstest zur frühzeitigen Diagnostik der hypophysären Dysfunktion statistisch abzusichern. 2019 veröffentlichte die Equine Endocrinology Group überarbeitete Empfehlungen zur Diagnostik einer PPID 10 Minuten nach TRH-Stimulation. Gegenüber Beech et al. (2007) und Durham et al. (2014), die strikt zwischen negativen und positiven Resultaten unterschieden, gibt die Gruppe ACTH-Konzentrationen von 110 – 200 pg/ml 10 Minuten post TRH als „equivocal“ an. Bei entsprechenden Testresultaten empfiehlt sie eine Reevaluierung nach 3 – 6 Monaten. Die ACTH-Konzentrationen der eigenen Probanden (Tab. 11), die nach Beech et al. (2007) bzw. Durham et al. (2014) auffällige Resultate in den Stimulationstests zeigten liegen ausnahmslos in diesem Bereich. Nach neuesten Erkenntnissen sprechen sie demnach nicht zweifelsfrei für das Vorliegen einer PPID.

4.2.4 Diskussion der Cortisol-Ergebnisse

In der Literatur finden sich laut Kenntnis der Autorin bislang keine Untersuchungen zum Cortisolverlauf nach Verabreichung verschiedener TRH-Dosierungen. Da in der eigenen Untersuchung festgestellt wurde, dass die beiden TRH-Dosierungen keinen signifikanten Einfluss auf die Höhe der ACTH AUCs hatten, war auch ein Dosiseinfluss auf die Cortisolkonzentrationen nicht zu erwarten, was sich in den eigenen Ergebnissen bestätigte ($p = 0,79$).

Der Cortisolverlauf infolge TRH-Stimulation beim Pferd wurde erstmalig von Beech et al. (1985) untersucht. Entgegen der eigenen Resultate, die einen Anstieg der Cortisolkonzentration mit Peaks 15 oder 30 Minuten nach TRH-Injektion aufzeigen, konnte die oben genannte Arbeitsgruppe nach intravenöser Injektion von 1 mg TRH bei 12 gesunden Pferden keinen Cortisolanstieg beobachten. Neben den klinisch gesunden Tieren waren auch für eine PPID auffällige Pferde untersucht worden. Bei diesen 11 Equiden lag die mittlere

Cortisolkonzentration mit 63,9 ng/ml 15 Minuten nach TRH-Gabe (1 mg/Tier) signifikant höher als die Basalwerte (33,6 ng/ml) und blieb bis 1,5 Stunden nach Stimulation erhöht. Aus diesen Ergebnissen folgernd stellte die Arbeitsgruppe die Vermutung auf, die Cortisolkonzentration infolge TRH-Stimulation als Diagnostikum für eine PPID-Erkrankung verwenden zu können (Beech et al. 1985). Auch in einer späteren Untersuchung von Beech et al. (2011a), in die die Ergebnisse 19 klinisch unauffälliger Pferde eingingen, lagen die Cortisol-Konzentrationen 14 und 30 Minuten nach TRH-Gabe ($6,85 \pm 2,43 \mu\text{g/dL}$ und $6,92 \pm 2,20 \mu\text{g/dL}$) nicht höher als die Basalkonzentration von $6,41 \pm 2,13 \mu\text{g/dL}$. Die ebenfalls untersuchten 13 Equiden, die mit klinischen Anzeichen für eine PPID aufgefallen waren, zeigten 14 Minuten nach Stimulation signifikant höhere prozentuale Anstiege der Cortisolkonzentration als die klinisch gesunden Vergleichstiere.

Entgegen der Studienresultate von Beech et al. (1985 und 2011a) beobachteten Thompson et al. (1995), Eiler et al. (1997) und McFarlane et al. (2006) auch bei klinisch gesunden Pferden Cortisolanstiege infolge TRH-Stimulation, was sich mit den Ergebnissen der eigenen Untersuchung deckt.

Thompson et al. (1995) untersuchten 11 gesunde Pferde und beobachteten 15 Minuten nach TRH-Gabe verglichen mit den basalen Konzentrationen prozentuale Cortisolanstiege von 17 – 105 %. Auch 19 der 22 eigenen Messungen lagen innerhalb dieser Spanne. Drei der eigenen Probanden (1, 4 und 8) zeigten mit prozentualen Anstiegen bis 170 % höhere Resultate. Bei Betrachtung der absoluten Konzentrationen dieser Probanden 15 Minuten nach Stimulation fällt auf, dass diese für zwei der drei Probanden mit 88 bzw. 64 nmol/l allerdings deutlich unterhalb des Mittelwerts aller Probanden von $106 \pm 30 \text{ nmol/l}$ liegen, sodass allein die relativ niedrigen Basalwerte ursächlich für die höheren prozentualen Anstiege zu sein scheinen.

McFarlane et al. (2006) führten TRH-Stimulationstests mit 1 mg TRH an 16 gesunden Pferden durch. Sie setzten die Cortisolkonzentration 30 Minuten nach TRH in Bezug zur Ausgangskonzentration und stellten zwischen diesen Zeitpunkten einen statistisch signifikanten Anstieg fest ($153 \pm 14,8 \text{ nmol/l}$ versus $205 \pm 9,3 \text{ nmol/l}$, $p < 0,001$). Mit basal $73 \pm 28,9$ versus $106 \pm 18,8 \text{ nmol/l}$ 30

Minuten post TRH liegen die an den eigenen Probanden erhobenen Konzentrationen insgesamt niedriger.

Wenngleich in der Veröffentlichung von Eiler et al. (1997), die 7 gesunde Pferde der Herde der University of Tennessee untersuchten, keine genauen Daten ersichtlich sind, formulieren die Autoren, dass sowohl bei den Gesunden als auch den fünf PPID-erkrankten Tieren ein signifikanter Cortisolanstieg infolge der TRH-Injektion auftrat.

In der eigenen Untersuchung zeigten die AUCs von ACTH und Cortisol keine Korrelation. Vergleichbare Untersuchungen beim Pferd, in denen beide Hormone miteinander in Bezug gesetzt wurden gibt es nach Kenntnis der Autorin nur sehr wenige. McFarlane et al. (2006) bestimmten zwar sowohl ACTH als auch Cortisol, setzten diese aber nicht zueinander in Relation.

Beech et al. (2011a) untersuchten Blutproben 19 klinisch gesunder Pferde 14, 30 und 60 Minuten nach Stimulation mit 1 mg TRH und setzten die absoluten Konzentrationen des Cortisols 30 Minuten nach Stimulation mit jener des ACTH 14 Minuten nach TRH-Injektion in Relation. Es wurde eine Korrelation zwischen beiden Parametern festgestellt. Ein Cortisolanstieg um $0,058 \pm 0,013$ Einheiten pro ACTH-Einheit wurde berechnet, dabei stieg das Cortisol bei weiblichen Tieren pro ACTH-Einheit deutlicher an als bei männlichen Vergleichstieren. Entsprechende Berechnungen anhand der eigenen Daten, erbrachten keinen Zusammenhang zwischen der ACTH-Konzentration 15 Minuten und der Cortisol-Konzentration 30 Minuten nach TRH ($r = 0,05$ für 1 $\mu\text{g/kg}$ TRH; $r = -0,26$ für 2 $\mu\text{g/kg}$ TRH).

2006 nutzten Bousquet-Melou et al. das Pferd als Modelltier um pathophysiologische Situationen der Hypophysen-Nebennierenachse beim Menschen zu simulieren. Sie verabreichten sieben verschiedene Dosen von synthetischem ACTH (0,005; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 2 und 10 $\mu\text{g/kg}$) mit dazwischen liegenden Washoutphasen von vier bis sieben Tagen an acht gesunde Reitpferde und bestimmten in der Folge die Cortisolkonzentrationen im Plasma. Die Cortisolplasmakonzentrationen über die Zeit zeigten nach den Gaben der ACTH Dosen eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung.

Aufgrund einer nur minimalen intraadrenalen Cortisol-speicherung besteht die Wirkung des ACTH an der Nebennierenrinde hauptsächlich darin die Cortisol-synthese zu steigern (Orth et al. 1998). Die Höhe der Cortisol-synthese wird sowohl von der Sekretionsrate als auch -dauer bestimmt (Bousquet-Melou et al. 2006). Während diese Arbeitsgruppe beim Pferd schon bei niedrigen ACTH Dosen ($\geq 0,1 \mu\text{g/kg}$) das Erreichen eines Cortisol-plateaus beobachten konnte, zeigte die Cortisol-Sekretionsdauer über die sich steigenden ACTH-Dosen hinweg eine kontinuierliche Verlängerung. Vergleichbare Erkenntnisse, dass sich ACTH-Dosen oberhalb einer gewissen Höhe nur noch auf die Dauer der Cortisol-erhöhung nicht aber auf die absolute Cortisol-höhe auswirken, wurden auch an Milchkühen gewonnen (Verkerk et al. 1994).

Die in der eigenen Untersuchung nach Gabe von 1 bzw. 2 $\mu\text{g/kg}$ TRH ausgelösten ACTH- und Cortisol-erhöhungen unterschieden sich statistisch nicht. Zu bedenken ist allerdings, dass zur Untersuchung einer möglichen Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen ACTH und Cortisol die Auswertung des Verhältnisses der absoluten Konzentrationen anstelle von AUCs sinnvoller gewesen wäre, da diese eine Differenzierung zwischen Cortisol-anstieg bzw. -dauer der erhöhten Spiegel nicht zulassen. Die Abbildungen 11 bis 16 verdeutlichen optisch gleichwohl, dass interindividuell sehr viel größere Unterschiede in den stimulierten ACTH- als in den Cortisol-verläufen bestehen, sodass die Skalierung der Cortisol-achse gleich gehalten werden konnte.

Um den Cortisol-verlauf infolge von Stimulationstests bzw. eine mögliche Korrelation zu ACTH näher zu untersuchen, sollten mögliche Einflüsse des Alters und der Jahreszeit auf die Cortisol-konzentrationen (Cordero et al. 2012, Donaldson et al. 2005) bei der Versuchsplanung berücksichtigt werden. Da beim Pferd 67 – 87 % des Cortisol-s an Protein gebunden vorliegen (Gayrard et al. 1996) und die Konzentration an Cortisol-bindendem Globulin (CBG) einen großen Einfluss auf den Cortisol-spiegel besitzt (Bright 1995), wäre eine Messung von CBG bzw. freiem Cortisol (Dhillon et al. 2002) sinnvoll.

Die vorliegende Studie galt dem Ziel des Vergleichs der beiden TRH-Dosen hinsichtlich der ACTH-Ausschüttung. Es kann festgehalten werden, dass bei den

gesunden eigenen Probanden durch 1 oder 2 µg/kg TRH weder unterschiedliche ACTH- noch unterschiedliche Cortisolantworten auslösbar waren.

4.2.5 Diskussion der Glukose- und Insulin-Ergebnisse

Zum Glukose- und Insulinverlauf beim Pferd infolge Stimulation mit TRH findet sich laut Kenntnis der Autorin in der Literatur bislang nur eine Untersuchung, die an der University of Pennsylvania, New Bolton Center durchgeführt wurde (Beech et al. 1985). Einer Kontrollgruppe, bestehend aus 12 gesunden Pferden, wurde 1 mg TRH intravenös verabreicht und über den Zeitraum von sechs Stunden (0,25; 0,5; 1; 1,5; 3; 4; 5; 6 Stunden) wiederholt Blutproben entnommen, in denen die Konzentration an Glukose sowie Insulin bestimmt wurden. Zu keinem der Zeitpunkte wurden signifikante Veränderungen der mittleren Insulin- bzw. Glukosekonzentration festgestellt, was vergleichbar zu den recht konstanten Glukoseverläufen der eigenen Arbeit ist.

Die Betrachtung der Glukose- sowie der Insulinverläufe der eigenen Probanden nach TRH-Stimulation sowie nach Placebo, die sehr ähnliche Kurven zeigten, legt die Vermutung nah, dass die Veränderungen über die Zeit wenig mit der TRH-Gabe zu tun haben, als vielmehr eine Folge der Fütterung von Heu 120 Minuten vor Stimulation darstellen. Die weitere Diskussion erfolgt daher im Kapitel zum Einfluss der Fütterung (Kapitel 4.2.8.3).

4.2.6 Diskussion der Schilddrüsenhormone

Hinsichtlich der Fragestellung eines Dosiseinflusses des TRH auf die Konzentrationen der dadurch freigesetzten Schilddrüsenhormone konnte in der eigenen Untersuchung lediglich für das fT4 ein signifikanter ($p = 0,04$) Zusammenhang beobachtet werden. Die fT4-Konzentration lag nach Verwendung von 2 µg/kg TRH signifikant höher als nach 1 µg/kg Körpergewicht. Erstaunlicherweise spielte die verwendete TRH-Dosis für die Hormonkonzentrationen von T4 und fT3 keine Rolle.

In der Literatur finden sich nur wenige Untersuchungen bei Pferden, in denen der Einfluss verschiedener TRH-Dosen auf die Schilddrüsenhormone untersucht wurde. Die nach Kenntnis der Autorin frühesten wurden von Chen et al. (1986) und Harris et al. (1992) durchgeführt. Da für das Pferd lange Zeit keine zuverlässige und validierte Methode zur Bestimmung von fT4 und fT3 bestand (Harris et al. 1992) sind diese Hormone in älteren Studien nicht berücksichtigt, sodass dort lediglich Werte für T4 publiziert wurden.

Chen et al. (1986) untersuchten mit 0,5; 1; 3 und 5 mg TRH pro Pferd an zwölf Tieren Dosierungen, die z.T. deutlich über die in der eigenen Untersuchung verwendeten Mengen hinausgehen, wobei der Dosiseinfluss auf die Hormonkonzentrationen nicht statistisch geprüft wurde. Betrachtet man die Resultate nach Gabe von 0,5 bzw. 1 mg TRH – jenen Dosierungen, die am besten vergleichbar zur eigenen Untersuchung sind – so liegen die mittleren Peak-Konzentrationen des T4 mit 225 % bzw. 242 % über dem Ausgangswert in recht ähnlichen Bereichen (Chen et al. 1986). Angaben über die jeweiligen Standardabweichungen gehen aus den Daten nicht hervor. Diese prozentualen Anstiege entsprechen recht gut den eigenen Ergebnissen mit 237 % nach 1 µg/kg TRH und 281 % nach 2 µg/kg TRH. Da Chen et al. (1986) nach 3 bzw. 5 mg TRH prozentuale Peaks von 242% bzw. 367% fanden, diskutieren sie eine progressive Erhöhung dieser prozentualen Anstiege mit zunehmender TRH-Dosis.

Ebenfalls vergleichbar mit den eigenen Ergebnissen stellten Harris et al. (1992) keine signifikanten Unterschiede der prozentualen T4-Anstiege vier Stunden nach Gabe von TRH zwischen den Dosierungen von 0,2; 0,5 und 1 mg TRH fest. Zudem konnten sie zeigen, dass – verglichen mit Placebo (Injektion von NaCl) – bereits die Gabe von 0,2 mg TRH zu einem signifikanten Anstieg von T4 führte. Der mittlere prozentuale Anstieg aller untersuchten Tiere (n = 17) vier Stunden nach Stimulation betrug bei dieser TRH-Dosis bereits 225 ± 70 %. Eine Stimulation der equinen Schilddrüse zur Ausschüttung von T4 scheint demnach bereits mit viel geringeren TRH-Dosierungen möglich zu sein, als sie in der eigenen Untersuchung verwendet wurden.

Breuhaus beschäftigte sich 2002 nach Kenntnis der Autorin als erste mit der Freisetzung auch der freien Schilddrüsenhormone nach Gabe von

unterschiedlichen TRH-Dosen. Stimulationstests an zwölf Pferden mit einem oder 5 mg TRH ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede in den absoluten Konzentrationen für T4, fT4 und fT3 (Breuhaus 2002).

In der eigenen Arbeit hingegen hatten sich die fT4 AUCs nach Gabe von 2 µg/kg statistisch höher gezeigt als nach 1 µg/kg TRH (Kapitel 3.2.9.3.1). Ein Trend zu höheren Konzentrationen nach Stimulation mit 2 µg/kg im Vergleich zu 1 µg/kg TRH war bei den eigenen Probanden auch für T4 und fT3 zu erkennen (Kapitel 3.2.9.2.1 und 3.2.9.4.1).

Ursächlich für die teils unterschiedlichen Resultate der zwei Arbeiten könnte die Verwendung von TRH-Dosen sehr unterschiedlicher Größenordnungen sein. Die Dosis von 1 mg TRH/Tier (Breuhaus 2002) und 2 µg/kg TRH der eigenen Untersuchung (entspricht 0,8 – 1,3 mg TRH pro Pferd) sind ungefähr miteinander vergleichbar. Während diese in der Arbeit von Breuhaus (2002) mit den Resultaten nach 5 mg TRH verglichen wurde, war die eigene Vergleichsdosis mit 0,4 – 0,6 mg (1 µg/kg TRH) deutlich geringer.

Zusammenfassend lässt sich für T4, fT4 und fT3 feststellen, dass wahrscheinlich bereits mit 2 µg/kg TRH eine maximale Stimulation der equinen Schilddrüse hervorgerufen wird, sodass die Verwendung höherer TRH-Dosen, wie durch Breuhaus (2002) gezeigt, keinen Steigerungseffekt der Schilddrüsenhormone bei gesunden Pferden hervorbringt. Die für fT4 anhand der eigenen Probanden erhobenen Daten deuten aufgrund des festgestellten Dosiseffekts darauf hin, dass die für eine maximale Stimulation notwendige Dosis zwischen 1 und 2 µg/kg TRH liegt. Der TRH-Stimulationstest als Diagnostikum für Schilddrüsenunterfunktionen sollte daher weiter mit 1 mg/Tier bzw. 2 µg/kg TRH durchgeführt werden.

Zu intraindividuellen Wiederholungsuntersuchungen finden sich interessante Ergebnisse in einer Studie von Somnardahl et al. (2005). Sie unterzogen vier Kontrollpferde über den Zeitraum von acht Wochen insgesamt fünf TRH-Stimulationstests im Abstand von jeweils zwei Wochen. Die Verumgruppe erhielt unterdessen eine Therapie mit aufsteigenden Dosierungen an Levothyroxin.

Die Konzentrationen der Schilddrüsenhormone der unbehandelten Kontrollen wiesen zwischen den jeweiligen Testzeitpunkten teils erhebliche Unterschiede auf, obwohl immer nach dem gleichen Prinzip vorgegangen und mit der gleichen Menge von 1,2 mg TRH stimuliert wurde. Diese intraindividuellen Schwankungen schon innerhalb von zwei Monaten sind bei der Interpretation derartiger Stimulationstests zusätzlich zu möglichen Dosiseffekten einzubeziehen.

Die basalen Konzentrationen der Schilddrüsenhormone in der eigenen Untersuchung zeigen große Ähnlichkeiten zu den in der Literatur veröffentlichten Daten. Breuhaus (2011) ermittelten für fT3 anhand der Werte von 71 erwachsenen Pferden Konzentrationen zwischen 0,1 – 5,9 pmol/l ($2,1 \pm 1,3$ pmol/l) als normal. Die Konzentrationen aller acht eigenen Probanden liegen mit 3,0 – 5,5 pmol/l ($4,0 \pm 0,8$ pmol/l) innerhalb dieser Spanne.

Ebenfalls untersuchte die Arbeitsgruppe um Breuhaus fT4 und gibt Konzentrationen zwischen 6 – 21 pmol/l ($11,0 \pm 2,8$ pmol/l; n = 71) an, die in der gleichen Größenordnung liegen wie die an den eigenen Probanden erhobenen Konzentrationen von 8,5 – 15,5 pmol/l ($10,1 \pm 3,3$ pmol/l).

Deutlich größere Spannweiten weisen die T4-Werte auf. Anhand der Daten der bereits oben genannten 71 Pferde gibt Breuhaus (2011) Bereiche zwischen 6 – 46 nmol/l ($20,0 \pm 9,4$ nmol/l) für normale T4-Basalkonzentrationen an. Sojka et al. (1993) verzeichnen mit 19,7 – 79,8 nmol/l ($24,5 \pm 3,0$ nmol/l; n = 12) eine weitere Spanne, die aufgrund der recht kleinen Standardabweichung aber wohl durch Ausreißer bedingt sein dürfte. In der eigenen Untersuchung wurden bei den acht Probanden basale Konzentrationen zwischen 14,2 – 39,6 nmol/l ($24,0 \pm 10,9$ nmol/l) festgestellt, die in etwa vergleichbar mit den Resultaten von Breuhaus sind.

Die eigene Beobachtung von interindividuell größeren Variationen zwischen den Basalwerten für T4 im Vergleich zu den intraindividuellen Variationen infolge der Stimulationen unterstreicht die Aussage von Sojka et al. (1993) zur Notwendigkeit von Stimulationstests zur Schilddrüsendiagnostik aufgrund mangelnder Aussagekraft von Einzelhormonmessungen.

Auffällig an den Daten der eigenen Probanden ist, dass in der Hälfte der Tests noch bis zu 60 Minuten nach Injektion von TRH niedrigere T4-Konzentrationen als basal gemessen wurden (Tab. 15). In der Literatur finden sich keine entsprechenden Verlaufsdaten nach Stimulation, da in den Veröffentlichungen meist nur einzelne Zeitpunkte wie Basal- oder Maximalkonzentrationen bzw. die Werte vor, sowie 2 und 4 Stunden nach TRH-Gabe angegeben sind.

In den 1980er Jahren wurden Untersuchungen durchgeführt, um den Zeitpunkt ab dem ein Anstieg der T4-Konzentrationen infolge TRH-Stimulation auftritt herauszufinden. Beech et al. (1985) konnten bereits eine Stunde, Chen et al. (1986) zwei Stunden nach TRH einen signifikanten T4-Anstieg beobachten. Vor diesem Hintergrund erscheint die nach 60 Minuten gemessene niedrigste T4-Konzentration von Proband 10 nach 1 µg/kg TRH (Tab. 15) nicht erklärbar.

Auch für das fT4 wurden fünf der 16 Minimalkonzentrationen erst 30 Minuten nach TRH-Injektion gemessen. Beachtet werden muss hier allerdings, dass diese maximal 0,8 nmol/l unterhalb der zum Zeitpunkt 0 gemessenen Konzentrationen lagen, sodass als Ursache auch physiologische Schwankungen oder methodische Variabilitäten bei der Messwiederholbarkeit infrage kommen. Offenbar benötigt die Freisetzung von T4 und fT4 aus der Schilddrüse nach Gabe von TRH somit mindestens 60 Minuten.

Maximale Konzentrationen werden laut Breuhaus (2002) für T4 und fT4 im Zeitraum zwischen 4 – 6 Stunden nach Stimulation erreicht. Diese Angaben decken sich sehr gut mit den eigenen Resultaten (Tab. 15 und 16). Harris et al. (1992) hatten den Zeitraum mit 3 – 4 Stunden für T4 deutlich früher angegeben. Eine Diskussion der unteren Angabe von drei Stunden ist anhand der eigenen Daten nicht möglich, da zum entsprechenden Zeitpunkt keine Blutanalyse durchgeführt wurde. 11 der 16 eigenen Probanden hatten nach vier Stunden noch nicht ihre maximale T4-Konzentration erreicht.

Lediglich Proband 5 fiel 120 Minuten nach Verabreichung von 2 µg/kg TRH deutlich früher mit einer maximalen fT4-Konzentration von 15,0 pmol/l auf. Warum dieses Pferd bereits so früh eine deutlich erhöhte Konzentration aufwies

ist unklar. Im weiteren Verlauf zeigte sich die Konzentration mit minimalen Differenzen von 0,3 bzw. 0,4 pmol/l bis 300 Minuten nach Stimulation konstant.

Für fT3 gibt Breuhaus (2002) den Zeitraum zwischen 2 – 4 Stunden post TRH-injectionem bis zum Erreichen des Maximums an. In sechs der insgesamt 16 eigenen Messungen wurden die maximalen Konzentrationen bereits früher erreicht (Tab. 17). Einer dieser Maximalwerte wurde bereits 60 Minuten, weitere fünf 90 Minuten nach Stimulation festgestellt. Die Unterschiede in den Zeitpunkten der Maxima zwischen den beiden Arbeiten könnten durch die unterschiedlichen Probeentnahmezeitpunkte begründet sein.

So führte Breuhaus (2002) Blutanalysen nach 60, 120, 240 und 360 Minuten durch. Denkbar ist demnach, dass auch in der Untersuchung von Breuhaus Individuen bereits zwischen 60 und 120 Minuten ihre maximalen fT3-Konzentrationen erreichten, aufgrund der anderen Probenzeitpunkte aber erst nach 120 Minuten detektiert wurden.

Bereits 1986 durch Chen et al. formuliert und nach weiteren Publikationen durch Sojka (1995) und Frank et al. (2002), beschreiben es Sommerdahl et al. (2005) als „*generally accepted*“, dass sich die T3 und T4-Konzentrationen innerhalb von 2 bzw. 4 Stunden nach TRH-Injektion verdoppeln sollten.

Breuhaus (2011) untersuchte die Schilddrüsenhormone von 36 gesunden Pferden mittels TRH Stimulationstests. Neben den basalen Werten wurde fT3 zwei Stunden sowie fT4 und T4 vier Stunden nach TRH-Gabe bestimmt und die jeweiligen Steigerungsfaktoren berechnet.

Zur übersichtlicheren Darstellung können diese der Tab. 21 entnommen werden. Die anhand der eigenen Daten (n = 8) errechneten mittleren Faktoren zeigen sich für alle Schilddrüsenhormone in vergleichbarer Größenordnung.

Tab. 21: Faktorielle Anstiege 2 Stunden (fT3) bzw. 4 Stunden (T4, fT4) nach TRH.
Mittelwert (Minimum – Maximum)

	fT3	T4	fT4
Breuhaus (2011)	4,2 (1,0 – 53)	2,2 (1,3 – 3,8)	1,7 (1,1 – 2,1)
Eigene Ergebnisse	3,1 (2,0 – 5,0)	2,4 (1,4 – 6,2)	2,1 (1,5 – 5,1)

Der Tabelle ist zu entnehmen, dass sich in beiden Untersuchungen nicht bei jedem Probanden innerhalb des genannten Zeitraums die Hormonkonzentrationen verdoppelten, wenngleich ausschließlich gesunde Tiere verwendet wurden. Ebenso wie in Untersuchungen von Beech et al. (1985), Sommardahl et al. (2005), Frank et al. (2008) und Breuhaus (2011) fiel auch in den eigenen Daten eine niedrigere T4-Antwort im Vergleich zu T3 auf TRH auf.

Proband 8, der sehr niedrige T4-Basalwerte aufwies, vier Stunden nach Stimulation mit TRH jedoch 5,6-fach bzw. 6,2-fach erhöhte Konzentrationen im Vergleich zum Ausgangswert zeigte, spiegelt die Beobachtung von Breuhaus (2011) wider, nach der Probanden mit sehr hohen relativen Antworten in der Regel sehr niedrige absolute Ruhewerte aufweisen. Dies unterstreicht nochmals, dass allein anhand niedriger, oft unterhalb der angegebenen Referenzbereiche liegende Schilddrüsenhormone die Diagnose einer Hypothyreose nicht gestellt werden kann.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich die eigenen Probanden hinsichtlich der Stimulation ihrer Schilddrüsen durch TRH nicht von den bislang publizierten Ergebnissen bei gesunden Pferden unterschieden. Interindividuell bestehen allerdings große Unterschiede, sodass festgestellt werden muss, dass die Funktion der Schilddrüse beim Pferd auch nach Verwendung von Stimulationstests nur schwer zu beurteilen ist. In mehreren Studien, in denen jeweils euthyroide Tiere untersucht wurden sind verschiedenste Begründungen aufgeführt, die erklären sollen, warum die als allgemeingültig angesehene Angabe der Verdopplung der Konzentrationen nach zwei bzw. vier Stunden für T3 und T4 eben nicht erfolgte. Vor diesem Hintergrund ist festzustellen, dass die

Ergebnisse des TRH-Tests es nicht erlauben, eine Unterfunktion der equinen Schilddrüse zweifelsfrei festzustellen.

4.2.7 Diskussion unerwünschter Symptome nach TRH

Mit Ausnahme einer Messung wurden bei allen Tests der eigenen Untersuchung unerwünschte Symptome nach TRH-Injektion beobachtet. Diese Häufigkeit liegt deutlich über den bisherigen Angaben in der Literatur. Beech et al. (1985) berichten vom Ausbleiben von Nebenwirkungen nach Gabe von 1 mg TRH an gesunde ($n = 12$) und PPID-erkrankte ($n = 11$) Pferde. Harris et al. (1992) beobachteten bei der Hälfte ihrer Probanden ($n = 17$) ein Kräuseln der Oberlippe während der TRH-Injektion.

Das sehr häufige Auftreten unerwünschter Symptome nach intravenöser TRH-Gabe wird vor dem Hintergrund, dass diese insgesamt als sehr mild eingeschätzt werden relativiert. Zudem beschränkten sie sich auf wenige Minuten nach der Applikation des TRH, wie es auch vielfach in der Literatur beschrieben ist (Beech et al. 2007, Goodale et al. 2015, Restifo et al. 2016).

In der eigenen Untersuchung konnte trotz Halbierung der TRH-Dosis keine Reduktion der Symptome (v.a. Kauen, Flehmen und Lippenlecken, Abb. 26) verzeichnet werden. Dies steht im Gegensatz zu Studien beim Hund, bei denen der Schweregrad von unerwünschten TRH-Wirkungen mit der TRH-Dosis korrelierte (Li et al. 1986). Die Autoren stimulierten 36 gesunde Hunde (8 – 23 kg Körpergewicht) mit unterschiedlichen TRH-Dosen zwischen 150 und 1100 µg. Unerwünschte Wirkungen wurden bei 4 dieser Tiere beobachtet, die mit 900 bzw. 1100 µg TRH die beiden höchsten Dosen erhalten hatten, wobei das Körpergewicht dieser 4 Hunde nicht aus den Daten hervorgeht. Die auftretenden unerwünschten Wirkungen zeigten sich mit Erbrechen, Speicheln oder Defäkation schwerwiegender, als die beim Pferd auftretenden Symptome. Zu bedenken ist, dass die pro kg Körpergewicht eingesetzten Mengen an TRH deutlich höher lagen, als jene in der eigenen Untersuchung. Sogar unter Annahme des maximalen Körpergewichts der Tiere von 23 kg betrug diese für

die Dosis von 900 bzw. 1100 µg TRH/Tier in etwa 39 bzw. 48 µg/kg Körpergewicht.

Bei den eigenen Probanden wurden am häufigsten Kauen, Flehmen, Lippenlecken und Husten festgestellt, wie sie in der Literatur seltener, aber regelmäßig beschrieben wurden (Beech et al. 2007, Goodale et al. 2015, Restifo et al. 2016). Auch ein bisher nur von Restifo et al. (2016) erwähntes, auffälliges Gähnen infolge einer TRH-Injektion konnte bei Proband 10 einmalig nach Stimulation mit 1 µg/kg TRH beobachtet werden.

Erwähnenswert scheint, dass das Symptom Husten, welches gerade für Besitzer am auffälligsten bzw. zugleich vermutlich am schwerwiegendsten beurteilt würde, in der eigenen Untersuchung nur bei zwei Probanden und ausschließlich bei der Dosis von 2 µg/kg TRH auftrat. Aufgrund der geringen Probandenzahl lässt sich nicht beurteilen, ob diese Beobachtung Zufall war oder eventuell doch als Reduktion eines unerwünschten Symptoms bei der geringeren Dosis von 1 µg/kg TRH zu werten sein könnte. Hinweise, dass ein Dosiseinfluss bestehen könnte finden sich in der Studie von Chen et al. (1986). Die Arbeitsgruppe stimulierte zwölf gesunde Stuten mit verschiedenen TRH-Dosierungen (0,5, 1, 3, 5 mg/Tier) und stellte fest, dass Tiere, denen höhere TRH-Dosen verabreicht worden waren, häufiger mit dem Symptom Husten auffielen als nach Stimulation mit niedrigeren TRH-Dosen. In der Untersuchung von Diez de Castro et al. (2014) hingegen reagierten sogar „most horses“ mit dem Symptom Husten auf die TRH-Injektion von dem üblichen 1 mg/Tier.

Ein möglicherweise bestehender Effekt der Injektionsgeschwindigkeit, wie er von Chen et al. (1986) zur Reduktion der unerwünschten Symptome formuliert ist, gilt es in zukünftigen Untersuchungen zu prüfen.

4.2.8 Diskussion des Einflusses der Raufuttergabe

In der eigenen Untersuchung wurde ein signifikanter Einfluss der Fütterung von Heu auf die Konzentrationen von Glukose, Insulin, fT4 und fT3 beobachtet. Für die übrigen Hormone ergaben sich keine Veränderungen zwischen den Werten,

die vor der Heugabe und zwei Stunden danach bestimmt wurden. Die einzelnen Parameter werden im Folgenden diskutiert.

4.2.8.1 Einfluss der Heugabe auf ACTH-Werte

In der Literatur finden sich laut Kenntnis der Autorin nur wenige Studien, die den Einfluss der Fütterung auf die ACTH-Konzentration untersuchen. Ohmura et al. (2012) beleuchteten einen möglichen Zusammenhang des Futterentzugs auf die Aktivität des autonomen Nervensystems anhand der Ergebnisse von fünf Pferden. Im Cross-over-Design verglichen sie eine Kontrollgruppe, die zweimal täglich Heu erhielt, mit einer Gruppe, der für insgesamt 37 Stunden das Futter entzogen worden war. Dreizehn, 18, 24, 30 und 36 Stunden nach Beginn des Nüchternstellens wurde ACTH im Blutplasma bestimmt. Die ACTH-Konzentrationen wiesen keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,6$) zwischen der Kontrollgruppe ($8,32 \pm 0,69$ pg/ml) und jener nach Futterentzug ($8,62 \pm 1,02$ pg/ml) auf. Dies entspricht den Beobachtungen aus der eigenen Untersuchung, in der sich zwischen den für 8 – 10 Stunden nüchtern und postprandial gemessenen ACTH-Konzentrationen ebenfalls kein signifikanter Unterschied zeigte ($p = 0,70$).

Vergleichbare Resultate erzielten auch Restifo et al. (2016). Sie untersuchten 30 Pferde an Tag 1 nachdem diese freien Zugang zu Heu hatten und wiederholten den Versuch 14 Tage später, wobei die Tiere diesmal die Nacht zuvor kein Futter erhalten hatten (nüchtern). Die basalen ACTH-Konzentrationen zeigten im Median mit 19,7 pg/ml (6,1 – 94,7) im gefütterten Test im Vergleich zu 20,6 pg/ml (4,5 – 88,7) nach Futterentzug keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,97$).

Die aus den eigenen Daten errechneten Mediane liegen mit 19,5 pg/ml nüchtern und 17,0 pg/ml (Zeitpunkt 0) nach Aufnahme von 1/5 der Tagesraufütterration (1,7 kg/100 kg KM) in sehr ähnlichen Bereichen. Zu betonen ist, dass der Range der Konzentrationen in der eigenen Untersuchung mit 11,0 – 25,5 pg/ml (nüchtern) und 8,5 – 28,0 pg/ml (gefüttert) deutlich geringer ausfällt als jener der amerikanischen Arbeitsgruppe, sodass auch die Mittelwerte mit $18,1 \pm 4,5$ bzw. $17,8 \pm 5,9$ pg/ml für nüchtern bzw. gefüttert in der eigenen Untersuchung sehr ähnlich sind.

Die spanische Arbeitsgruppe um Diez de Castro (2014) führte Untersuchungen zum Vergleich der Konzentrationen gefütterter vs. nüchterner Pferde ($n = 50$) durch, die dem eigenen Versuchsablauf sehr nah kommen. Vergleichbar zur eigenen Studie wurden die Pferde über Nacht (12 Stunden) nüchtern gestellt und erhielten dann eine definierte Menge Heu (3 kg Alfalfa-Heu), die sie innerhalb von zwei Stunden fressen konnten, bevor die abschließende Blutprobenentnahme erfolgte. Entgegen der eigenen Resultate stellten die Autoren einen signifikanten Fütterungseinfluss fest ($p = 0,007$). Die basale ACTH-Konzentration lag mit $17,4 \pm 0,8$ pg/ml bei den nüchternen Pferden signifikant niedriger als bei den gefütterten Individuen ($23,5 \pm 2,1$ pg/ml).

Für die gegensätzlichen Resultate zwischen den Untersuchungen könnten verschiedene Haltungsbedingungen bzw. Unterschiede in der Fütterung verantwortlich sein. So wurde in der spanischen Untersuchung Alfalfa-Heu verwendet und zudem mit 3 kg/Tier im Vergleich zu max. 2,1 kg/Tier (Proband 10) in der eigenen Untersuchung eine größere Menge verfüttert. Durch die höheren Rohproteingehalte im Alfalfa-Heu im Vergleich zu Heu (Coenen 2014), welches in der eigenen Untersuchung verwendet wurde, bzw. die Menge könnten die Unterschiede in den Resultaten hervorgerufen sein.

Von einer Ausnahme abgesehen lassen sich die publizierten Studien und die eigenen Ergebnisse dahingehend zusammenfassen, dass zumindest eine mäßige Heugabe keinen Einfluss auf die basalen ACTH-Konzentrationen beim Pferd zu haben scheint.

4.2.8.2 Einfluss der Heugabe auf Cortisol-Werte

In der eigenen Untersuchung hatte die Heufütterung keinen Einfluss auf die Höhe der Cortisolkonzentration ($p = 0,16$). Laut Kenntnis der Autorin finden sich in der Literatur nur sehr wenige vergleichbare Studien. In den veröffentlichten Arbeiten liegt das Ziel vielmehr darin, den möglichen Einfluss eines Nahrungsentzugs auf die Konzentration an Cortisol zu bestimmen (Freestone et al. 1991, Messer et al. 1995, Ohmura et al. 2012).

Ohmura et al. (2012) verglichen im Cross-over-Design paarweise die Cortisolkonzentrationen zweier Gruppen ($n = 5$) zu mehreren Zeitpunkten. Dabei

wurde eine Gruppe wie gewohnt zweimal täglich mit Heu gefüttert (Kontrollgruppe), während der anderen Gruppe über insgesamt 37 Stunden das Futter entzogen wurde. Ausschließlich 24 Stunden nach der letzten Fütterung zeigten die Probanden unter Futterentzug signifikant höhere Cortisolkonzentrationen als unter Kontrollbedingungen ($p < 0,05$).

Bei Messer et al. (1995) war ein signifikanter Anstieg ($p = 0,02$) der Cortisolkonzentrationen erst zwei Tage nach Nahrungsentzug festzustellen, während in einer älteren Untersuchung an sieben Ponies das Nüchternstellen sogar über fünf Tage an keinem Tag die Konzentration des Cortisols signifikant beeinflusste (Freestone et al. 1991).

Mit 48 (Messer et al. 1995) bzw. 24 Stunden (Ohmura et al. 2012) war die Nüchternphase deutlich länger als die in der eigenen Untersuchung bestehende Nüchternphase von 8 – 10 Stunden. Den besten Vergleich bietet daher die Untersuchung von Bertin et al. (2016), in der Cortisolkonzentrationen nach Fütterung sowie nach Fastenlängen von 3, 6 und 12 Stunden bestimmt wurden. Mit $3,31 \pm 1,38 \mu\text{g/dl}$ (gefüttert), $3,03 \pm 0,65$ (3 Stunden nüchtern), $3,73 \pm 1,04$ (6 Stunden nüchtern), und $3,59 \pm 0,93$ (12 Stunden nüchtern) lagen die Konzentrationen in sehr ähnlichen Bereichen wurden aber nicht statistisch ausgewertet. Folglich stimmen die eigenen Resultate mit jenen von Bertin et al. (2016) insofern überein, dass eine Heugabe nach bis zu 12 Stunden Nüchternzeit keinen Einfluss auf die Cortisolspiegel bei gesunden Pferden besitzt.

4.2.8.3 Einfluss der Heugabe auf Glukose und Insulin

Wie zu erwarten wurden sowohl für Glukose als auch Insulin hoch signifikante Einflüsse der Fütterung festgestellt ($p = 0,0008$ bzw. $p = 0,002$), wobei die Konzentrationen vor der Fütterung niedriger als 120 Minuten nach Gabe der Heuration (Zeitpunkt 0) lagen.

Freestone et al. (1991) beobachteten bei acht Ponys, dass bereits 24 Stunden nach Futterentzug signifikant niedrigere Werte ($p < 0,0001$) sowohl für Glukose als auch Insulin festzustellen waren. Ohmura et al. (2012) verglichen bei fünf Vollblütern im Cross-over-Design die Glukosekonzentrationen 24 Stunden nach Futterentzug mit einer Kontrollgruppe, die wie gewohnt zweimal täglich mit Heu

gefüttert wurde. Nach der eintägigen Nüchternphase lagen die Glukosekonzentrationen signifikant niedriger ($p < 0,05$) als in der Kontrolle.

Die Nüchternphase in der eigenen Arbeit war mit 8 – 10 Stunden deutlich kürzer. Untersuchungen für Zeiträume vergleichbarer Länge wurden von einer Arbeitsgruppe um den Kanadier Bertin (2016) an 10 Pferden durchgeführt. Im Vergleich der Glukose- sowie Insulinkonzentrationen von Pferden, die gefüttert waren oder 3, 6 oder 12 Stunden hungerten wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Vor diesem Hintergrund scheint es unwahrscheinlich, dass das Nüchternstellen für 8 – 10 Stunden in der eigenen Untersuchung die Glukose- bzw. Insulinkonzentrationen erniedrigt hat.

Bei 7 der 22 eigenen Messungen ist die 120 Minuten postprandial bestimmte Glukosekonzentration zugleich die Maximalkonzentration, die in den übrigen 15 Messungen 125-135 Minuten postprandial und damit 5 – 15 Minuten post TRH gemessen wurde. In der Literatur wird das Auftreten von Peaks infolge von Heufütterung nach 105 Minuten (Stull et al. 1995) bzw. $111 \pm 11,3$ Minuten (Harris et al. 2005) etwas früher beschrieben, als es in der eigenen Untersuchung beobachtet wurde.

Der Anstieg der Glukosekonzentration bei den eigenen Probanden von basal $5,3 \pm 0,7$ mmol/l auf $5,9 \pm 0,8$ mmol/l nach 120 Minuten ($p = 0,0008$) ähnelt stark den Daten, die in der Literatur zu finden sind. So stellten Stull und Rodiek (1988) vier Quarterwallachen Luzerne-Heu in einer Menge zur Verfügung, die nach Empfehlungen des National research Council 25% ihres täglichen Energiebedarfs deckte. Sie beobachteten einen Anstieg der Glukosekonzentration von basal 97,4 mg/dl ($\pm 5,4$ mmol/l) auf maximal 103 mg/dl ($\pm 5,7$ mmol/l). Entgegen der eigenen Untersuchung konnte die kalifornische Arbeitsgruppe jedoch keine statistische Signifikanz für diesen Anstieg zeigen.

Warum fünf der eigenen Probanden nüchtern bereits Blutglukosekonzentrationen oberhalb des Referenzbereichs von 3,1 – 5,1 mmol/l (Untersuchungslabor Biocontrol [Bioscientia, Institut für medizinische Diagnostik GmbH, Ingelheim]) aufwiesen, ist nicht eindeutig zu klären.

Grundsätzlich muss eine Erhöhung der Glukosekonzentration durch Stressreaktionen (Toth et al. 2010, Bröjer et al. 2013) in Betracht gezogen werden. Da solche jedoch weder äußerlich erkennbar waren, noch Hinweise darauf aus den entsprechenden Cortisolkonzentrationen der Probanden hervorgehen, erscheint dies unwahrscheinlich.

Genau wie für Glukose waren auch für die Insulinkonzentrationen 120 Minuten nach Fütterung (Zeitpunkt 0) in 5 der 22 eigenen Messungen maximale Werte zu verzeichnen. Bei den übrigen 17 Messungen wurden diese zu den Zeitpunkten 125, 130 oder 135 Minuten nach Fütterung (Zeitpunkt 5, 10 oder 15 Minuten post TRH) festgestellt.

Die Spanne von 15 Minuten post TRH, in denen sämtliche Insulinmaxima der eigenen Probanden gemessen wurden, ist verglichen mit Angaben in der Literatur relativ kurz. So nennen Glade et al. (1985) einen Zeitraum von 1 – 3 Stunden, Borer et al. (2012) 2 – 4 Stunden und Rapson et al. (2018) 90 – 120 Minuten bis zum Erreichen von Maximalwerten infolge der Fütterung.

Da in der eigenen Untersuchung lediglich vor und 120 Minuten nach der Heugabe Insulinwerte bestimmt wurden, ist denkbar, dass höhere Werte während der zwei Stunden in denen keine Analysen stattfanden, erreicht wurden. Weiterhin könnte die einheitliche Fütterung der Probanden mit 1/5 der gewöhnlichen Raufuttermenge (1,7 kg Heu/100kg KGW/Tag), die von allen Probanden innerhalb von 90 – 120 Minuten aufgenommen wurde ursächlich für zeitlich dicht beieinander liegende Maxima sein.

Eine kalifornische Untersuchung von Stull und Rodiek (1988) scheint der Autorin gut für den Vergleich mit der eigenen Arbeit geeignet. Sie stellten vier Quarter-Horse-Pferden Alfalfa-Heu in einer Menge zur Verfügung, die entsprechend Empfehlungen des National Research Council 25 % ihres täglichen Energiebedarfs entsprach und bestimmten in der Folge über insgesamt acht Stunden den Insulinverlauf über wiederholte Blutprobenanalysen. Ausgehend von mittleren Konzentrationen nüchtern von $4,5 \pm 2,1 \mu\text{U/ml}$ ($\pm 32,6 \pm 15,2 \text{ pmol/l}$) wurde ein Anstieg bis zum Maximum auf $9,1 \pm 2,9 \mu\text{U/ml}$ ($\pm 65,9 \pm 21,0 \text{ pmol/l}$) beobachtet – wann die Peaks nach Fütterung von Alfalfa-Heu auftraten geht nicht

aus den Daten hervor. Der anhand der eigenen Probanden ermittelte Anstieg von $24,6 \pm 14,3$ pmol/l nüchtern auf das Maximum von $64,2 \pm 45,5$ pmol/l liegt in einem ähnlichen Bereich.

Vor allem inter- sowie bei drei Probanden intraindividuell variierten die Insulinmaxima teils erheblich. Ein ursächlicher Einfluss des TRH kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da entsprechende Unterschiede auch schon vor Stimulation mit dem Releasinghormon festgestellt wurden.

Weiter könnten Unterschiede im Nährstoffgehalt des Heus für die interindividuell unterschiedlich stark ausgeprägten Insulinreaktionen verantwortlich sein. Da die Stimulationstests über den Zeitraum von einem Jahr hinweg in unterschiedlichen Stallungen durchgeführt wurden, ist es wahrscheinlich, dass Heuchargen mit deutlichen Unterschieden in ihren Gehalten an löslichen Kohlenhydraten verfüttert wurden. In Bezug auf die intraindividuellen Unterschiede scheint dieser Aspekt allerdings vernachlässigbar, da maximal 14 Tage zwischen den Tests lagen.

Vor dem Hintergrund, dass die Insulinantwort nach Heufütterung verglichen mit gemischten Diäten insgesamt gering ausfällt (Stull et al. 1988) erscheinen unterschiedliche Nährstoffgehalte im Heu unwahrscheinlich um intraindividuelle Unterschiede der Insulinmaxima von bis zu 88 pmol/l (Proband 4) zu erklären.

Schließlich könnten die Unterschiede noch einer schlechten Reproduzierbarkeit von Insulinkonzentration „in vivo“ geschuldet sein. Zu diesem Resultat kamen Schuver et al. (2014), die an 21 Quarterstuten wiederholt orale Glukose-Tests durchführten.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die Glukose- und Insulinkonzentrationen – wie zu erwarten – durch Heugabe, jedoch nicht durch Injektion von TRH beeinflusst werden.

Da in praxi häufig eine gleichzeitige Abklärung des equinen metabolischen Syndroms über basale Insulinspiegel und einer PPID indiziert ist sollte in diesen Fällen folglich auch auf eine Heugabe verzichtet werden. Für die alleinige ACTH-Bestimmung bzw. den TRH-Stimulationstest scheint der Verzicht auf Heu dagegen nicht erforderlich.

4.2.8.4 Einfluss der Heugabe auf die Schilddrüsenhormone

In der eigenen Arbeit wurden die Schilddrüsenhormone im nüchternen Zustand mit den Werten zwei Stunden nach der Heufütterung verglichen und für fT4 ($p = 0,01$) und fT3 ($p = 0,04$) nach Heugabe signifikant höhere Konzentrationen festgestellt. Laut Kenntnis der Autorin finden sich in der Literatur keine Untersuchungen mit vergleichbarer Fragestellung. Bislang veröffentlichte Arbeiten verglichen Ausgangskonzentrationen mit jenen nach unterschiedlich langen Nüchternphasen.

Messer et al. (1995) untersuchten bei sechs gesunden Pferden die Hormonkonzentrationen basal sowie nach einer Nüchternzeit von 1, 2, 3 und 4 Tagen. Für T3 sowie die freien Schilddrüsenhormone fT4 und fT3 stellten sie bereits nach einem Tag Hungern signifikant niedrigere Konzentrationen fest ($p < 0,05$).

In der von Hilderbran et al. (2014) durchgeführten Studie konnte für fT3 bereits bei Nüchternzeiten unter einem Tag ein Absinken der Konzentrationen unterhalb des Normalbereichs beobachtet werden. Statistisch signifikante fT4-Abfälle zeigten sich bei den Autoren erst ab einer Nahrungskarenz von 1 bis 2 Tagen, wobei die Konzentrationen innerhalb des Referenzbereichs blieben.

Signifikante Abfälle in der T4-Konzentration stellten Messer et al. (1995) erst nach 2 Tagen Hungern, Hilderbran et al. (2014) sogar erst nach Nüchternzeiten von mindestens drei Tagen fest. Zusammengefasst zeigen beide Studien, dass die Konzentrationen der freien Schilddrüsenhormone sowie von T3 schon nach relativ kurzen Nüchternphasen absinken, während T4-Konzentrationen auch bei längeren Hungerzuständen konstant gehalten werden.

Ähnliche Beobachtungen konnten auch beim Hund gemacht werden. De Bruijne et al. (1981) ließen 9 Hunde über einen Zeitraum von 2 Wochen hungern und verglichen die jeweils dreimal wöchentlich bestimmten Konzentrationen von T4 und T3 mit den Kontrollwochen vor bzw. nach der Hungerphase. Während T4 keine signifikanten Veränderungen zeigte, sank die T3-Konzentration im Verlauf der Nüchternphase kontinuierlich von 85 ± 10 ng/ml auf 34 ± 8 ng/ml.

Da Hilderbran et al. (2014) die Angabe „unter einem Tag“ zeitlich nicht näher definieren und Messer et al. (1995) bereits in ihrer ersten Messung 24 Stunden

nach Nüchternstellen signifikant niedrigere Werte feststellten geht aus den Publikationen nicht hervor ab welcher minimalen Nüchternzeit es zur Beeinflussung der fT4 und fT3-Konzentrationen kommt.

Daher könnte die relativ kurze Nüchternzeit von 8 – 10 Stunden in der eigenen Untersuchung bereits ausreichend gewesen sein um die fT4- bzw. fT3-Konzentrationen, nicht aber T4 signifikant zu senken. Die beobachteten signifikanten Anstiege nach der Fütterung könnten lediglich durch Beendigung der Nüchternzeit und damit eine Rückkehr in den für das Individuum üblichen Bereich zustande kommen.

Zu dieser These finden sich Ergebnisse in der Studie von Messer et al. (1995). Sie fütterten die oben genannten Tiere nach der Nüchternphase von vier Tagen mit ihrer gewöhnlichen Ration und stellten 72 Stunden nachdem diese zur Verfügung gestellt wurde signifikant höhere fT4-Konzentration fest. Zwar ist die Zeitspanne von 72 Stunden gegenüber den 2 Stunden in der eigenen Studie deutlich länger, allerdings ist diese zugleich die einzige Messung in der Untersuchung von Messer et al. (1995). Aufgrund der eigenen Ergebnisse ist davon auszugehen, dass signifikante Anstiege nach Fütterung im Anschluss einer vorangegangenen Nüchternphase schon früher zu verzeichnen sind.

Um die Fragestellung des Einfluss von Nüchternzeiten bzw. danach erfolgender Futteraufnahme auf die basalen wie stimulierten Konzentrationen der Schilddrüsenhormone zu klären wären künftig weitere Untersuchungen wünschenswert.

4.2.9 Diskussion des Einflusses der Tageslichtlänge

Die Erfassung der Tageslichtlänge in der eigenen Untersuchung erfolgte zur Überprüfung eines saisonalen Einflusses auf die ACTH-Konzentration, nachdem Donaldson et al. (2005) einen solchen als erste für basale ACTH-Konzentrationen beschrieben hatten. Dabei lag die ACTH-Konzentration im September signifikant höher als in den Vergleichsmonaten Januar und Mai ($p < 0,001$). In zahlreichen weiteren Arbeiten wurden übereinstimmende

Beobachtungen gemacht (Beech et al. 2007, Beech et al. 2009, Place et al. 2010, Frank et al. 2010, Funk et al. 2011, Cordero et al. 2012, Diez de Castro et al. 2014).

Während somit zahlreiche Untersuchungen zum saisonalen Einfluss auf die basale ACTH-Konzentration publiziert sind, gibt es laut Kenntnis der Autorin nur zwei Arbeitsgruppen, die einen saisonalen Einfluss auch auf die TRH-stimulierten ACTH-Konzentrationen untersuchten (Funk et al. 2011, Diez de Castro et al. 2014).

Bei den eigenen Probanden konnte keine Korrelation zwischen den ACTH AUCs und der Tageslichtlänge beobachtet werden ($p = 0,16$). Die Ergebnisse der eigenen Arbeit stehen damit im Gegensatz zu den Resultaten, die sich in der Literatur finden. So wurden in einer amerikanischen Untersuchung an der Auburn University (Alabama, USA) erstmals statistisch signifikante Unterschiede der ACTH-Antwort infolge TRH-Stimulation in verschiedenen Monaten gezeigt (Funk et al. 2011). Bei den neun gesunden Pferden lagen die stimulierten ACTH-Werte nach TRH, vergleichbar mit den Resultaten des basalen ACTHs, im Februar signifikant niedriger ($p < 0,001$) als im Juli, August, September und Oktober. Dabei scheint erwähnenswert, dass sich die Tageslichtlängen in dem nordamerikanischen Südstaat zwischen dem 21.12. mit 10 Stunden und dem 21.06. mit 14 Stunden und 17 Minuten nur relativ gering unterscheiden (<https://www.timeanddate.com/sun/usa/auburn-al?month=6&year=2019>, letzter Zugriff März 2020)

Vergleichbare Resultate erzielten auch Diez de Castro et al. (2014). In ihrer Untersuchung verglichen sie die Ergebnisse zwischen zwei Zeitperioden. Bei den sechs gesunden Probanden zeigten sich in den Monaten Juli – September sowohl 10 Minuten ($p = 0,03$) als auch 30 Minuten ($p = 0,03$) nach TRH signifikant höhere ACTH-Konzentrationen als in den Monaten März – April.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die aus der Literatur hervorgehenden Ergebnisse einheitlich einen saisonalen Einfluss mit höheren ACTH-Konzentration im späten Sommer und frühen Herbst zeigen, was die

Frage aufwirft warum in der eigenen Untersuchung keine vergleichbaren Resultate beobachtet wurden.

Einerseits muss in Betracht gezogen werden, dass die eigene Untersuchung mit elf Probanden für diese Fragestellung nicht ausreichend groß gewesen sein könnte um statistische Signifikanzen hervorzubringen. Da sich die Stimulationstests über den gesamten Jahresverlauf erstreckten, lagen pro Monat nur wenige Datensätze vor. Dies spielt für das Hauptziel der Studie keine Rolle, da hierfür intraindividuelle Vergleiche von TRH-Tests stattfanden, die innerhalb von maximal 14 Tagen wiederholt wurden.

Weiterhin ist zu bedenken, dass für die Auswertung der eigenen Daten die absolute Tageslichtlänge herangezogen wurde. Untersuchungen von Beech et al. (2009) deuten darauf hin, dass nicht die Länge der Photoperiode per se, sondern ein Abnehmen der Tageslichtdauer ursächlich für die spätsommerlich ansteigende ACTH-Konzentration ist. Eine Erfassung der Tageslichtlänge unter Berücksichtigung der Zu- oder Abnahme wäre daher in der eigenen Untersuchung sinnvoll gewesen. In der Literatur wird dieser Aspekt berücksichtigt indem Daten bestimmter Monate miteinander verglichen werden (Funk et al. 2011, Diez de Castro et al. 2014) bzw. unterschiedliche Photoperioden definiert werden (Beech et al. 2009). Aufgrund der monatlich geringen Anzahl an TRH-Tests wurde auf eine solche Auswertung in der eigenen Untersuchung verzichtet.

In Zukunft wären also weitere Untersuchungen mit einem größeren Probandenumfang und Einschluss des Kriterium abnehmender bzw. zunehmender Tageslichtlänge erforderlich, um die in der Literatur bestehenden Hinweise auf einen saisonalen Einfluss auch auf die TRH-stimulierten ACTH-Konzentrationen abzusichern.

4.2.10 Diskussion des Einflusses des Body Condition Scores (BCS)

In Bezug auf den BCS wurden in der eigenen Untersuchung positive Korrelationen mit Insulin und Cortisol, dort allerdings lediglich nach Stimulation mit 1 µg/kg TRH, festgestellt.

4.2.10.1 Korrelation des BCS mit Insulin

Sowohl nach 1 µg/kg wie auch 2 µg/kg TRH zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen BCS und Insulin AUC ($p = 0,03$; $r = 0,63$ bzw. $p = 0,04$; $r = 0,65$).

Für den Zusammenhang zwischen BCS und Insulin beim Pferd finden sich in der Literatur einige Untersuchungen mit ähnlichen Resultaten. Hoffman et al. (2003) untersuchten zehn Probanden unterschiedlichen BCSs und stellten mit Hilfe eines modifizierten intravenösen Glukosetests bei den adipösen Tieren (BCS 7 – 9 von maximal 9) signifikant höhere Plateau-Insulinkonzentrationen fest als bei normalgewichtigen Pferden (BCS 5,0 – 5,9) oder jenen mit mäßig erhöhtem BCS von 6,0 – 6,9. Auch Frank et al. (2006b) ermittelten in einer Gruppe von adipösen Pferden ($BCS \geq 7$, $n = 7$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (BCS 4/9 bis 6/9, $n = 5$) sechsfach erhöhte basale Insulinkonzentrationen ($p = 0,007$) und berechneten somit eine positive Korrelation zwischen basalem Insulin und BCS ($r = 0,76$, $p = 0,004$). Zudem wurde von der amerikanischen Arbeitsgruppe an den gleichen Probanden ein kombinierter Glukose-Insulin-Test (cGIT) durchgeführt. Für diesen wurde zunächst Glukose (150 mg/kg) und im Anschluss Insulin (0,1 U/kg) intravenös verabreicht und über einen Zeitraum von insgesamt 150 Minuten nach Insulininjektion insgesamt 13 Blutproben entnommen und analysiert. Für die daraus errechneten AUCs wurde ebenfalls eine statistisch signifikante positive Korrelation zum BCS festgestellt ($r = 0,84$, $p < 0,001$).

In einer weiteren Untersuchung wurde das Körpergewicht von 13 Probanden über einen Zeitraum von insgesamt 30 Wochen gesteigert (Carter et al. 2009). Durch die Zufütterung konnte ein Anstieg von initialen 440 ± 44 kg KGW (BCS $6,2 \pm 1,0$) in Periode 1 (Woche 0 – 3) auf ein Maximum von 528 ± 48 kg (BCS $8,0 \pm 0,7$) in Periode 4 (Woche 17 – 25) erzielt werden. Der Vergleich der in den jeweiligen Zeiträumen gemessenen basalen Insulinkonzentrationen brachte in Periode 4 signifikant höhere Konzentrationen ($p < 0,05$) hervor.

Zusammenfassend stimmen die Resultate der eigenen Untersuchung somit gut mit jenen aus der Literatur überein. Vergleichbare Zusammenhänge wurden auch bei anderen Spezies wie dem Menschen, der Maus, dem Hund und beim

Kaninchen beobachtet (Surwit et al. 1988, Erdmann et al. 2008, Zhao et al. 2008, Gayet et al. 2004, Gayet et al. 2007).

Ursächlich scheint das Fettgewebe in seiner Funktion als endokrines Organ zu sein (Kershaw et al. 2004). Beim Menschen konnte eine erhöhte Anzahl an Makrophagen im Fettgewebe festgestellt werden (Di Gregorio et al. 2005). Über die aus den Makrophagen sezernierten inflammatorischen Zytokine (z.B. IL6, TNF α), sowie die Expression von Adipokinen (z.B. Leptin, Adiponektin, Resistin) aus den Adipozyten besteht bei Fettleibigkeit ein chronisches leichtes Entzündungsgeschehen, worüber es zur Beeinflussung von Insulinsignalwegen kommt (Chen 2006, Rasouli et al. 2008, Carter et al. 2009, Frank et al. 2010, Hart et al. 2016).

Vick et al. (2007) konnten in ihrer Untersuchung Belege für diese Theorie auch am Pferd zeigen. Sie bestimmten bei 60 Stuten (BCS 4 – 9) die Konzentrationen von IL6 und TNF α im Blut und setzten diese in Bezug zur Insulinkonzentration bzw. dem BCS. Sowohl IL6 als auch TNF α waren positiv korreliert mit dem BCS, während TNF α , sowie der BCS eine negative Korrelation mit der Insulinsensitivität aufwiesen.

4.2.10.2 Korrelation des BCS mit Cortisol

Die Korrelation zwischen BCS und der Cortisol AUC zeigte sich in der eigenen Untersuchung nur nach Stimulation mit 1 $\mu\text{g/kg}$ nicht aber nach 2 $\mu\text{g/kg}$ TRH statistisch signifikant ($p = 0,04$; $r = 0,64$ bzw. $p = 0,30$; $r = 0,34$).

Ähnliche Resultate – für basale Cortisolkonzentrationen – wurden auch in der Arbeit von Hart et al. (2016) erzielt. Sie untersuchten über mehrere Monate hinweg insgesamt jeweils vier Blutproben von 57 Kontrolltieren, die anhand ihres BCS in schlanke (BCS $4,3 \pm 1,0$, $n = 22$) und adipöse Probanden (BCS $6,7 \pm 0,8$, $n = 35$) unterteilt worden waren. Die schlanken Tiere zeigten mit $3,8 \pm 1,1$ ($2,3 - 6,1$) $\mu\text{g/dL}$ gegenüber $4,8 \pm 1,8$ ($1,4 - 20,2$) $\mu\text{g/dL}$ bei den adipösen Studienteilnehmern signifikant niedrigere Cortisolkonzentrationen ($p < 0,05$).

Dieser Zusammenhang wird höchstwahrscheinlich durch eine infolge der Fettleibigkeit zunehmende Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse (HPA-Achse) bedingt (Aguilar-Valles et al. 2015).

Weiterhin ist Fettgewebe in der Lage über die 11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 (11- β -HSD1) den inaktiven Cortisolmetaboliten Cortison enzymatisch in das biologisch aktive Cortisol umzuwandeln, was die höheren Konzentrationen bei Adipositas bedingen kann (Anagnostis et al. 2009, Rask et al. 2001).

Für die Tatsache, warum der Zusammenhang zwischen dem BCS und der Cortisol AUC lediglich nach Verwendung von 1 μ g/kg TRH statistisch signifikant war, scheint es aus Sicht der Autorin keine Erklärung zu geben. Vermutlich liegt dies in der geringen Probandenzahl und ihrer geringen Variabilität im BCS ($5,7 \pm 1,4$ Punkte) begründet, die nicht ausreichend ist um sicher statistische Unterschiede hervorzubringen.

5 Zusammenfassung

Der TRH-Stimulationstest wird gewöhnlich in einer Dosierung von 1 mg TRH/Tier durchgeführt, was bei einem Körpergewicht von 500 kg 2 µg/kg TRH entspricht. Hauptziel der eigenen Arbeit war es bei gesunden Pferden zu prüfen, ob eine Dosisreduktion des TRH um 50% zu einer geringeren ACTH-Ausschüttung aus der Hypophyse führt. Als Nebenparameter wurden Cortisol, Glukose und Insulin sowie die Schilddrüsenhormone fT3, fT4 und T4 nach Stimulation mit 2 µg/kg versus 1 µg/kg TRH verglichen.

In die randomisierte Studie im Cross-over-Design wurden entsprechend der vorab erfolgten biometrischen Planung elf Pferde und Ponys eingeschlossen. Alle Probanden beendeten die Untersuchungen ohne Beeinträchtigungen.

Als Einschlusskriterien galten das Fehlen klinischer Anzeichen einer PPID sowie unauffällige Resultate labordiagnostischer Untersuchungen (Hämatologie, klinische Chemie, basaler ACTH-Wert und ab einem Alter von 15 Jahren eine physiologische Suppression des körpereigenen Cortisols nach Dexamethason). Unter Einhaltung einer Washoutphase von 6 bis 14 Tagen wurden in randomisierter Reihenfolge 1 µg/kg oder 2 µg/kg TRH injiziert – vier zufällig ausgewählte Tiere erhielten zudem 0,9%ige Natriumchloridlösung als Placebo. Mit einem Scoringsystem wurden innerhalb von 15 Minuten nach den Injektionen auftretende Symptome semiquantitativ erfasst und mittels Wilcoxon-Test für Paardifferenzen auf Unterschiede zwischen den TRH-Dosierungen überprüft.

Unmittelbar vor sowie 5, 10, 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach der TRH- bzw. Placeboinjektion erfolgten Blutprobenentnahmen. Die Schilddrüsenhormone wurden bei 8 Probanden zusätzlich nach 240, 300 und 360 Minuten gemessen. Eine weitere Probennahme erfolgte zwei Stunden vor TRH-Injektion, unmittelbar bevor die Pferde mit 1/5 der gewöhnlichen Heurration (1,7 kg/100 kg KGW) gefüttert wurden.

Zur statistischen Auswertung wurden AUCs über 90 (ACTH, Cortisol, Glukose, Insulin) bzw. 360 Minuten (Schilddrüsenhormone) Testdauer ermittelt und mittels Varianzanalyse in der Cross-over-Modifikation auf mögliche Effekte der Dosis sowie der Reihenfolge, in der diese verabreicht wurden, geprüft. Ein Einfluss der

TRH-Dosis wurde lediglich für fT4 festgestellt – nach 2 µg/kg wurden signifikant höhere ($p = 0,04$) fT4 AUCs erzielt als nach 1 µg/kg TRH. Für keinen Parameter ergab sich ein signifikanter Einfluss der Reihenfolge, in der die beiden TRH-Dosierungen verabreicht wurden.

Nach 95 % der TRH-Gaben wurden in den ersten Minuten Symptome wie Kauen, Flehmen und Lippenlecken beobachtet. Ihr Auftreten konnte durch die reduzierte TRH-Dosis nicht gesenkt werden.

Ein möglicher Einfluss der Heugabe auf die Laborparameter wurde mit dem t-Test für abhängige Stichproben geprüft. Grundlage für die Berechnung bildeten die Mittelwerte beider Versuchsreihen zwei Stunden und unmittelbar vor TRH-Injektion. Signifikant höhere Werte nach der Fütterung wurden für Insulin ($p = 0,002$), Glukose ($p = 0,0008$), fT4 ($p = 0,01$) und fT3 ($p = 0,04$) gezeigt, während sich für ACTH, Cortisol und T4 keine statistisch signifikanten Unterschiede ergaben.

Drei der vermeintlich gesunden Probanden zeigten in beiden TRH-Tests absolute ACTH-Konzentrationen oberhalb publizierter Cutoff-Werte (Beech et al. 2007, Durham et al. 2014), die zur PPID-Diagnostik herangezogen werden. Die sechs Messungen lagen 10 Minuten post TRH im Bereich zwischen 110 – 200 pg/ml, der durch die Equine Endocrinology Group (2019) neuerdings als „equivocal“ klassifiziert wird. Einer dieser Probanden wies nach 23 Monaten keinerlei klinische Symptome und einen basalen ACTH-Wert im Referenzbereich auf. Andererseits zeigten die beiden anderen Tiere 15 bzw. 33 Monate später pathologische basale ACTH-Werte. Diese Beobachtung belegt nach Kenntnis der Autorin erstmals die These, dass der TRH-Stimulationstest eine ansonsten labordiagnostisch noch nicht detektierbare erhöhte ACTH-Produktion der Pars intermedia der equinen Hypophyse nachzuweisen vermag.

Die eigenen Ergebnisse belegen, dass die Halbierung der üblichen TRH-Dosis von 2 auf 1 µg/kg Körpergewicht bei gesunden Pferden zur gleichwertigen Ausschüttung des für die PPID Diagnostik zielführenden Parameters ACTH führt. In Zukunft ist somit zu prüfen ob dies auch für an einer PPID erkrankte Tiere gilt und somit die niedrigere TRH Dosis zur Diagnostik einer PPID geeignet ist.

6 Summary

Usually, the TRH-stimulation test is performed with 1 mg TRH/horse, which equals 2 µg/kg in a 500 kg horse. The aim of the study was to investigate the effect of a 50% dose reduction on the ACTH release of the pituitary gland. In addition to ACTH, cortisol, glucose and insulin as well as the thyroid hormones fT3, fT4 and T4 were compared in healthy horses after injection of either 2 µg/kg or 1 µg/kg TRH.

According to biometric planning, eleven horses and ponies which showed no clinical or laboratory signs of PPID were included in the randomized study with a cross-over design. All probands finished the study without impairment. Normal values in haematology, blood biochemistry, basal ACTH and a normal response in an overnight-dexamethasone suppression test in animals which were older than 14 years were further inclusion criteria. The equines received either 1 µg/kg or 2 µg/kg TRH in a randomized order with a wash out period of 6 to 14 days. Additionally, 4 probands received 0.9% saline as a placebo. Possible adverse effects occurring within 15 minutes after injecting TRH or placebo were scored according to a specifically developed system and were tested with Wilcoxon signed-rank test for differences between TRH dosages.

All laboratory parameters were measured directly before, as well as 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 minutes after TRH or placebo injection. Thyroid hormones additionally were quantified in 8 horses after 240, 300 and 360 minutes. To investigate the effect of food intake, all parameters were measured directly before feeding one fifth of daily hay requirements (1.7 kg/100 kg bodyweight) two hours before TRH or placebo injection.

For statistical analyses AUCs were calculated over 90 (ACTH, cortisol, glucose, insulin; n=11) or 360 minutes (thyroid hormones; n=8). One-way ANOVA in a modification for cross-over studies was used to evaluate differences between TRH dosages and order of dosages. A dose effect was just seen in fT4 – after 2 µg/kg TRH, fT4 AUCs were significantly larger compared to 1 µg/kg TRH (p=0.04). No significant effects were noted due to the order, in which dosages were randomly applied.

In 95% of TRH tests, symptoms like chewing, flehmen and lip licking were seen within the first minutes after injection. A reduction of these symptoms after 1 µg/kg TRH was not noted.

A student t-test, comparing values two hours and directly before TRH or placebo, was used to investigate the impact of feeding. Insulin ($p=0.002$), glucose ($p=0.0008$), fT4 ($p=0.01$) and fT3 ($p=0.04$) showed significant increases, whereas for ACTH, cortisol and T4 no statistically relevant differences were detected.

Three horses showed ACTH values above formerly recommended cutoffs for diagnosing PPID (Beech et al. 2007, Durham et al. 2014) 10 minutes after both TRH applications. All six measurements ranged from 110 to 200 pg/ml and would be classified nowadays as “*equivocal*” by the equine endocrinology group (2019). One of these horses was still symptom-free and had a normal basal ACTH 23 months after initial TRH-tests. However, the other two showed pathological baseline ACTH concentrations 15 or 33 months after having equivocal results in the TRH stimulation tests. To the author’s knowledge, this substantiates for the first time the hypothesis, that the TRH test is able to detect early and otherwise not detectable increases in ACTH production.

The results presented here show for the first time, that there is no difference in ACTH release, which is the primary parameter for diagnosing PPID, between 2 µg/kg and 1 µg/kg TRH in healthy horses. Thus, in future it should be investigated if lower TRH concentrations are sufficient to diagnose PPID.

7 Literaturverzeichnis

Ackermann H., 2010.

BiAS. für Windows, Biometrische Analyse von Stichproben, Version 9.08., Epsilon-Verlag, Hochheim, Darmstadt.

Aguilar-Valles A., Inoue W., Rummel C., Luheshi G.N., 2015.

Obesity adipokines and neuroinflammation. *Neuropharmacology* 96, 124-134.

Alberts M.K., McCann J.P., Woods P.R., 2000.

Hemithyroidectomy in a horse with confirmed hyperthyroidism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 217, 1051-1054.

Alexander S.L., Irvine C.H., Donald R.A., 1996.

Dynamics of the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis determined using a nonsurgical method for collecting pituitary venous blood from horses. *Frontiers in Neuroendocrinology* 17, 1-50.

Alila-Johansson A., Eriksson L., Soveri T., Laakso M.L., 2003.

Serum cortisol levels in goats exhibit seasonal but not daily rhythmicity. *Chronobiology International* 20, 65-79.

Anagnostis P., Athyros V.G., Tziomalos K., Karagiannis A., Mikhailidis D.P., 2009.

Clinical review: The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. *Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94, 2692-2701.

Asplin K.E., Sillence M.N., Pollitt C.C., McGowan C.M., 2007.

Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies. *Veterinary Journal* 174, 530-535.

Ayala I., Martos N.F., Silvan G., Gutierrez-Panizo C., Clavel J.G., Illera J.C., 2012.

Cortisol, adrenocorticotrophic hormone, serotonin, adrenaline and noradrenaline serum concentrations in relation to disease and stress in the horse. *Research in Veterinary Science* 93, 103-107.

Babson A.L., 2013.

Immulite® and Immulite 1000. In: Wild D., B.: *The Immunoassay Handbook*, 4th Edition, Elsevier, Amsterdam, 571-574.

Barett K.E., Barman S.M., Boitano S., Brooks H.L., 2010.

The thyroid gland In: Barett K.E., Barman S.M., Boitano S., Brooks H.L., B.: *Ganong's review of medical physiology*, 23rd Edition, The McGraw-Hill Companies, 301-314.

Baucus K.L., Squires E.L., Ralston S.L., McKinnon A.O., Nett T.M., 1990.
Effect of transportation on the estrous cycle and concentrations of hormones in mares. *Journal of Animal Science* 68, 419-426.

Beech J., Garcia M., 1985.
Hormonal response to thyrotropin-releasing hormone in healthy horses and in horses with pituitary adenoma. *American Journal of Veterinary Research* 46, 1941-1943.

Beech J., Boston R., Lindborg S., Russell G.E., 2007.
Adrenocorticotropin concentration following administration of thyrotropin-releasing hormone in healthy horses and those with pituitary pars intermedia dysfunction and pituitary gland hyperplasia. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 231, 417-426.

Beech J., Boston R.C., McFarlane D., Lindborg S., 2009.
Evaluation of plasma ACTH, α -melanocyte-stimulating hormone, and insulin concentrations during various photoperiods in clinically normal horses and ponies and those with pituitary pars intermedia dysfunction. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 235, 715-722

Beech J., Boston R., Lindborg S., 2011a.
Comparison of cortisol and ACTH responses after administration of thyrotropin releasing hormone in normal horses and those with pituitary pars intermedia dysfunction. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25, 1431-1438.

Beech J., McFarlane D., Lindborg S., Sojka J.E., Boston R.C., 2011b.
 α -Melanocyte--stimulating hormone and adrenocorticotropin concentrations in response to thyrotropin-releasing hormone and comparison with adrenocorticotropin concentration after domperidone administration in healthy horses and horses with pituitary pars intermedia dysfunction. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 238, 1305-1315.

Bertin F.R., Taylor S.D., Bianco A.W., Sojka-Kritchevsky J.E., 2016.
The effect of fasting duration on baseline blood glucose concentration, blood insulin concentration, glucose/insulin ratio, oral sugar test, and insulin response test results in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 30, 1726-1731.

Borer K.E., Bailey S.R., Menzies-Gow N.J., Harris P.A., Elliott J., 2012.
Effect of feeding glucose, fructose, and inulin on blood glucose and insulin concentrations in normal ponies and those predisposed to laminitis. *Journal of Animal Science* 90, 3003-3011

Boswell T., Woods S.C., Kenagy G.J., 1994.
Seasonal changes in body mass, insulin, and glucocorticoids of free-living golden-mantled ground squirrels. *General and Comparative Endocrinology* 96, 339-346.

Boujon C.E., Bestetti G.E., Meier H.P., Straub R., Junker U., Rossi G.L., 1993.
Equine pituitary adenoma: a functional and morphological study. *Journal of Comparative Pathology* 109, 163-178.

Bousquet-Mélou A., Formentini E., Picard-Hagen N., Delage L., Laroute V., Toutain P., 2006.

The adrenocorticotropin stimulation test. Contribution of physiologically based model developed in horse for its interpretation in different pathophysiological situations encountered in man. *Endocrinology* 147, 4281-4291.

Breuhaus B.A., 2002.

Thyroid-stimulating hormone in adult euthyroid and hypothyroid horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 16, 109-115.

Breuhaus B.A., 2011.

Disorders of the equine thyroid gland. *The Veterinary clinics of North America. Equine Practice* 27, 115-128.

Bright G.M., 1995.

Corticosteroid-binding globulin influences kinetic parameters of plasma cortisol transport and clearance. *Journal of Endocrinology and Metabolism* 80, 770-775

Bröjer J., Lindase S., Hedenskog J., Alvarsson K., Nostell K., 2013.

Repeatability of the combined glucose-insulin tolerance test and the effect of a stressor before testing in horses of 2 breeds. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27, 1543-1550.

Brosnahan M.M., Paradis M.R., 2003.

Demographic and clinical characteristics of geriatric horses: 467 cases (1989-1999). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 223, 93-98.

Capen C.C., Martin S.L., 1989.

The Pituitary Gland. In: McDonald L.E., Pineda M.H., B.: *Veterinary endocrinology and reproduction*. 4. Auflage, Lea und Febiger, Philadelphia, London, 19-57.

Carmalt J.L., Mortazavi S., McOnie R.C., Allen A.L., Unniappan S., 2018.

Profiles of pro-opiomelanocortin and encoded peptides, and their processing enzymes in equine pituitary pars intermedia dysfunction. *PLOS ONE* 13, e0190796.

Carmalt J.L., Waldner C.L., Allen A.L., 2017.

Equine pituitary pars intermedia dysfunction: an international survey of veterinarians' approach to diagnosis, management, and estimated prevalence. *Canadian Journal of Veterinary Research* 81, 261-269.

Carter R.A., McCutcheon L.J., George L.A., Smith T.L., Frank N., Geor R.J., 2009.

Effects of diet-induced weight gain on insulin sensitivity and plasma hormone and lipid concentrations in horses. *American Journal of Veterinary Research* 70, 1250-1258.

Cawley N.X., Li Z., Loh Y.P., 2016.

60 years of POMC: Biosynthesis, trafficking, and secretion of pro-opiomelanocortin-derived peptides. *Journal of Molecular Endocrinology* 56, T77-97.

Chen H., 2006.

Cellular inflammatory responses: novel insights for obesity and insulin resistance. *Pharmacological Research* 53, 469-477.

Chen C.L., Li W.I., 1986.

Effect of thyrotropin releasing hormone (TRH) on serum levels of thyroid hormones in thoroughbred mares. *Journal of Equine Veterinary Science* 6, 58-61.

Coenen M., 2014.

Tabellenanhang, In: Meyer H., Coenen M., B.: *Pferdefütterung*, 5.Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, 269-316.

Colborn D.R., Thompson D.L., Roth T.L., Capehart J.S., White K.L., 1991.

Responses of cortisol and prolactin to sexual excitement and stress in stallions and geldings. *Journal of Animal Science* 69, 2556-2562.

Copas V.E., Durham A.E., 2012.

Circannual variation in plasma adrenocorticotrophic hormone concentrations in the UK in normal horses and ponies, and those with pituitary pars intermedia dysfunction. *Equine Veterinary Journal* 44, 440-443.

Cordero M., Brorsen B.W., McFarlane D., 2012.

Circadian and circannual rhythms of cortisol, ACTH, and alpha-melanocyte-stimulating hormone in healthy horses. *Domestic Animal Endocrinology* 43, 317-324.

Cotran R.S., Kumar V, Collins T., 1999.

The endocrine system. In: Cotran R.S. B.: *Robbins pathologic basis of disease*. 6.Auflage, WB Saunders, Philadelphia, 1121-1169.

Couëtill L., Paradis M.R., Knoll J., 1996.

Plasma adrenocorticotropin concentration in healthy horses and in horses with clinical signs of hyperadrenocorticism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 10, 1-6.

De Bruijne J.J., Altszuler N., Hampshire J. Visser T.J., Hackeng W.H., 1981.
Fat mobilisation and plasma hormone levels in fasted dogs. *Metabolism* 30,
190-194.

Dhillon W.S., Kong W.M., Le Roux C.W., Alaghband-Zadeh J., Jones J., Carter
G., Mendoza N., Meeran K., O'Shea D., 2002.
Cortisol-binding globulin is important in the interpretation of dynamic tests of the
hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *European Journal of Endocrinology* 146,
231-235.

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. *Domestic animal endocrinology* 48,
77-83.

Di Gregorio G.B., Yao-Borengasser A., Rasouli N., Varma V., Lu T., Miles L.M.,
Ranganathan G., Peterson C.A., McGehee R.E., Kern P.A., 2005.
Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in
human adipose and muscle tissues association with cytokine expression, insulin
resistance, and reduction by pioglitazone. *Diabetes* 54, 2305-2313.

Dixon W.J., 1993.
BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2. University of California
Press, Berkeley, Los Angeles, London.

Donaldson M.T., LaMonte B.H., Morrese P., Smith G., Beech J., 2002.
Treatment with pergolide or cyproheptadine of pituitary pars intermedia
dysfunction (equine Cushing's disease). *Journal of Veterinary Internal Medicine*
16, 742-746.

Donaldson M.T., McDonnell S.M., Schanbacher B.J., Lamb S.V., McFarlane D.,
Beech J., 2005.
Variation in plasma adrenocorticotrophic hormone concentration and
dexamethasone suppression test results with season, age, and sex in healthy
ponies and horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19, 217-222.

Durham A.E., McGowan C.M., Fey K., Tamzali Y., Kolk J.H., 2014.
Pituitary pars intermedia dysfunction: Diagnosis and treatment. *Equine
Veterinary Education* 26, 216-223.

Dybdal N.O., Hargreaves K.M., Madigan J.E., Gribble D.H., Kennedy P.C.,
Stabenfeldt G.H., 1994.
Diagnostic testing for pituitary pars intermedia dysfunction in horses. *Journal of
the American Veterinary Medical Association* 204, 627-632.

Eiler H., Oliver J.W., Andrews F.M., Fecteau K.A., Green E.M., McCracken M., 1997.

Results of a combined dexamethasone suppression/thyrotropin-releasing hormone stimulation test in healthy horses and horses suspected to have a pars intermedia pituitary adenoma. Journal of the American Veterinary Medical Association 211, 79-81.

Ellis J.M., Hollands T., 1998.

Accuracy of different methods of estimating the weight of horses. The Veterinary Record 143, 335-336.

Erben R.G., 2005.

Knochen und Calciumhomöostase, In: von Engelhardt W., Breves G., B.: Physiologie der Haustiere, 2.Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, 580-587.

Erdmann J., Kallabis B., Oppel U., Sypchenko O., Wagenpfeil S., Schusdziarra V., 2008.

Development of hyperinsulinemia and insulin resistance during the early stage of weight gain. American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism 294, E568-575.

Equine Endocrinology Group

sites.tufts.edu/equineendogroup (letzter Zugriff Februar 2020)

Evans M.J., Mulligan R.S., Livesey J.H. Donald R.A., 1996.

The integrative control of adrenocorticotropin secretion: a critical role of corticotrophin-releasing hormone. Journal of Endocrinology 148, 475-483.

Fouché N., van der Kolk J.H., Bruckmaier R.M., Luz I., Foerster G., Gerber V., 2015.

Venipuncture does not affect adrenocorticotrophic hormone concentration in horses. Veterinary Record 177, 223-223.

Frank N., Sojka J., Messer N.T., 2002.

Equine thyroid dysfunction. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice 18, 305-319.

Frank N., Andrews F.M., Sommardahl C.S., Eiler H., Rohrbach B.W., Donnell R.L., 2006a.

Evaluation of the combined dexamethasone suppression/thyrotropin-releasing hormone stimulation test for detection of pars intermedia pituitary adenomas in horses. Journal of Veterinary Internal Medicine 20, 987-993.

Frank N., Elliott S.B., Brandt L.E., Keisler D.H., 2006b.

Physical characteristics, blood hormone concentrations, and plasma lipid concentrations in obese horses with insulin resistance. Journal of the American Veterinary Medical Association 228, 1383-1390.

Frank N., Buchanan B.R., Elliott S.B., 2008.

Effects of long-term oral administration of levothyroxine sodium on serum thyroid hormone concentrations, clinicopathologic variables, and echocardiographic measurements in healthy adult horses. *American Journal of Veterinary Research* 69, 68-75.

Frank N., Elliott S.B., Chameroy K.A., Tóth F., Chumbler N.S., McClamroch R., 2010.

Association of season and pasture grazing with blood hormone and metabolite concentrations in horses with presumed pituitary pars intermedia dysfunction. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24, 1167-1175.

Freestone J.F., Wolfsheimer K.J., Ford R.B., Church G., Bessin R., 1991.

Triglyceride, insulin, and cortisol responses of ponies to fasting and dexamethasone administration. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 5, 15-22.

Funk R.A., Stewart A.J., Wooldridge A.A., Kwessi E., Kemppainen R.J.,

Behrend E.N., Zhong Q., Johnson A.K., 2011.

Seasonal changes in plasma adrenocorticotrophic hormone and alpha-melanocyte-stimulating hormone in response to thyrotropin-releasing hormone in normal, aged horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25, 579-585.

Gary K.A., Chronwall B.M., 1992.

The onset of dopaminergic innervation during ontogeny decreases melanotrope proliferation in the intermediate lobe of the rat pituitary. *International Journal of Developmental Neuroscience* 10, 131-142.

Gayet C., Bailhache E., Dumon H., Martin L., Siliart B., Nguyen P., 2004.

Insulin resistance and changes in plasma concentration of TNF α , IGF1, and NEFA in dogs during weight gain and obesity. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 88, 157-165.

Gayet C., Leray V., Saito M., Siliart B., Nguyen P., 2007.

The effects of obesity-associated insulin resistance on mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma target genes, in dogs. *The British Journal of Nutrition* 98, 497-503.

Gayrard V., Alvinerie M., Toutain P.L., 1996.

Interspecies variations of corticosteroid-binding globulin parameters. *Domestic Animal Endocrinology* 13, 35-45.

Gershengorn M.C., Osman R., 1996.

Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Physiological Reviews – American Journal of Physiology* 76, 175-191.

Glade M.J., Reimers T.J., 1985.

Effects of dietary energy supply on serum thyroxine, tri-iodothyronine and insulin concentrations in young horses. *Journal of Endocrinology* 104, 93-98.

González-Ramírez R., Chen Y., Liedtke W.B., Morales-Lázaro S.L., 2017.

TRP channels and pain. In: Emir T.L.R., B: Neurobiology of TRP channels, 2. Auflage, CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, 125-148.

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, 437-444.

Ham J., Smyth D.G., 1984.

Regulation of bioactive beta-endorphin processing in rats pars intermedia. *FEBS Letters* 175, 407-411.

Harris P.A., Marlin D., Gray J., 1992.

Equine thyroid function tests. A preliminary investigation. *British Veterinary Journal* 148, 71-80.

Harris P.A., Sillence M., Inglis R., Siever-Kelly C., Friend M., Munn K., Davidson H., 2005.

Effect of short (<2cm) lucerne chaff addition on the intake rate and glycaemic response of a sweet feed. *Pferdeheilkunde* 21, 87-88.

Hart K.A., Heusner G.L., Norton N.A., Barton M.H., 2009.

Hypothalamic-pituitary-adrenal axis assessment in healthy term neonatal foals utilizing a paired low dose/high dose ACTH stimulation test. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23, 344-351.

Hart K.A., Wochele D.M., Norton N.A., McFarlane D., Wooldridge A.A., Frank N., 2016.

Effect of age, season, body condition, and endocrine status on serum free cortisol fraction and insulin concentration in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 30, 653-663.

Heinrichs M., Baumgärtner W., Capen C.C., 1990.

Immunocytochemical demonstration of proopiomelanocortin-derived peptides in pituitary adenomas of the pars intermedia in horses. *Veterinary Pathology* 27, 419-425.

Henneke D.R., Potter G.D., Kreider J.L., Yeates B.F., 1983.

Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Veterinary Journal* 15, 371-372.

- Hernández-Castellano L.E., Hernández L.L., Bruckmaier R.M., 2020.
Review: Endocrine pathways to regulate calcium homeostasis around parturition and the prevention of hypocalcemia in periparturient dairy cows. *Animal* 14, 330-338.
- Hilderbran A.C., Breuhaus B.A., Refsal K.R., 2014.
Nonthyroidal illness syndrome in adult horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28, 609-617.
- Hillyer M.H., Taylor F.G.R., Mair T.S., Murphy D., Watson T.D.G., Love S., 1992.
Diagnosis of hyperadrenocorticism in the horse. *Equine Veterinary Education* 4, 131-134.
- Hoffman R., Boston R., Stefanovski D., Kronfeld D., Harris P., 2003.
Obesity and diet affect glucose dynamics and insulin sensitivity in thoroughbred geldings. *Journal of Animal Science* 81, 2333-2342.
- Hoffsis G.F., Murdick P.W., 1970.
The plasma concentrations of corticosteroids in normal and diseased horses. *Journal of American Veterinary Medical Association* 157, 1590-1593
- Horjales-Araujo E., Hellysaz A., Broberger C., 2014.
Lateral hypothalamic thyrotropin-releasing hormone neurons: distribution and relationship to histochemically defined cell populations in the rat. *Neuroscience* 277, 87-102
- Huang B., Zhou X., Xue Z., Lu X., 2013.
Electrochemiluminescence quenching of tris (2,2'-bipyridyl)ruthenium. *Trends in Analytical Chemistry* 51, 107-116.
- Hurcombe S.D.A., 2011.
Hypothalamic-pituitary gland axis function and dysfunction in horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 27, 1-17.
- Ingram J.R., Crockford J.N., Matthews L.R., 1999.
Ultradian, circadian and seasonal rhythms in cortisol secretion and adrenal responsiveness to ACTH and yarding in unrestrained red deer (*cervus elaphus*) stags. *Journal of Endocrinology* 162, 289-300.
- Kershaw E.E., Flier J.S., 2004.
Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89, 2548-2556.
- Köller G., Bassewitz K., Schusser G.F., 2016.
Referenzbereiche von Insulin, insulinähnlichem Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) und adrenokortikotropem Hormon bei Ponys. *Tierärztliche Praxis Großtiere* 44, 19-25.

- Krieger D.T., Luria M., 1977.
Plasma ACTH and cortisol responses to TRF, vasopressin or hypoglycemia in Cushing's disease and Nelson's syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 44, 361-368
- Larsen A.T., Sonne N., Andreassen K.V., Karsdal M.A., Henriksen K., 2020.
The calcitonin receptor plays a major role in glucose regulation as a function of dual amylin and calcitonin receptor against therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 374, 74-83.
- Li W.I., Chen C.L., Tiller A.A., Kunkle G.A., 1986.
Effects of thyrotropin-releasing hormone on serum concentrations of thyroxine and triiodothyronine in healthy, thyroidectomized, thyroxine-treated, and propylthiouracil-treated dogs. *American Journal of Veterinary Research* 47, 163-169.
- Loeb W.F., Capen C.C. Johnson L.E., 1966.
Adenomas of the pars intermedia associated with hyperglycemia and glycosuria in two horses. *Cornell University College of Veterinary Medicine* 56, 623-626.
- Lorenz M.D., Stiff M.E., 1980.
Serum thyroxine content before and after thyrotropin stimulation in dogs with suspected hypothyroidism. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 177, 78-81.
- Lori D.N., MacLeay J.M., 2001.
Hypothyroidism in the Horse. *Journal of Equine Veterinary Science* 21, 8-11.
- Lothrop C.D., Nolan H.L., 1986.
Equine thyroid function assessment with the thyrotropin-releasing hormone response test. *American Journal of Veterinary Research* 47, 942-944.
- Love S., 1993.
Equine cushing's disease. *British Veterinary Journal* 149, 139-153.
- Malven P.V., 1997.
Pituitary gland neuroendocrinology. *Proceedings of the 15th Annual Forum of the American College of Veterinary Internal Medicine*, 462-467.
- McFarlane D., 2011.
Equine pituitary pars intermedia dysfunction. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice* 27, 93-113.
- McFarlane D., 2019.
Diagnostic testing for equine endocrine diseases: confirmation versus confusion. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice* 35, 327-338.

- McFarlane D., Donaldson M.T., McDonnell S.M., Cribb A.E., 2004.
Effects of season and sample handling on measurement of plasma alpha-melanocyte-stimulating hormone concentrations in horses and ponies. *American Journal of Veterinary Research* 65, 1463-1468.
- McFarlane D., Dybdal N., Donaldson M.T., Miller L., Cribb A.E., 2005.
Nitration and increased alpha-synuclein expression associated with dopaminergic neurodegeneration in equine pituitary pars intermedia dysfunction. *Journal of Neuroendocrinology* 17, 73-80.
- 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. *Domestic Animal Endocrinology* 30, 276-288.
- McGowan T.W., Pinchbeck G.P., McGowan C.M., 2013.
Prevalence, risk factors and clinical signs predictive for equine pituitary pars intermedia dysfunction in aged horses. *Equine Veterinary Journal* 45, 74-79
- McKeever K.H., 2011.
Endocrine alterations in the equine athlete: an update. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 27, 197-218.
- Messer N.T., Johnson P.J., 2007.
Evidence-Based Literature Pertaining to Thyroid Dysfunction and Cushing's Syndrome in the Horse. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 23, 329-364.
- Messer N.T., Johnson P.J., Refsal K.R., Nachreiner R.F., Ganjam V.K., Krause G.F., 1995.
Effect of food deprivation on baseline iodothyronine and cortisol concentrations in healthy, adult horses. *American Journal of Veterinary Research* 56, 116-121.
- Miller M.A., Moore G.E., Bertin F.R., Kritchevsky J.E., 2016.
What's new in old horses? Postmortem diagnoses in mature and aged equids. *Veterinary Pathology* 53, 390-398.
- Millington W.R., Dybdal N.O., Mueller G.P., Chronwall B.M., 1992.
N-acetylation and C-terminal proteolysis of beta-endorphin in the anterior lobe of the horse pituitary. *General and Comparative Endocrinology* 85, 297-307.
- Mills P.C., Ng J.C., Kramer H., Auer D.E., 1997.
Stress response to chronic inflammation in the horse. *Equine Veterinary Journal* 29, 483-486.

Morris D.D., Garcia M., 1983.

Thyroid-stimulating hormone: response test in healthy horses, and effect of phenylbutazone on equine thyroid hormones. *American Journal of Veterinary Research* 44, 503-507.

Möstl E., 2005.

Spezielle Endokrinologie, In: von Engelhardt W., Breves G., B.: *Physiologie der Haustiere*, 2.Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, 477-494.

Muñoz M.C., Doreste F., Ferrer O., González J., Montoya J.A., 1996.

Pergolide treatment for cushing's syndrome in a horse. *Veterinary Record* 139, 41-43.

Musumeci G., Castorina S., Castrogiovanni P., Loreto C., Leonardi R., Aiello F.C., Magro G., Imbesi R., 2015.

A journey through the pituitary gland. Development, structure and function, with emphasis on embryo-foetal and later development. *Acta Histochemica* 117, 355-366.

O'Dowd B.F., Lee D.K., Huang W., Nguyen T., Cheng R., Liu Y., Wang B., Gershengorn M.C., George S.R., 2000.

TRH-R2 exhibits similar binding and acute signaling but distinct regulation and anatomic distribution compared with TRH-R1. *Molecular Endocrinology* 14, 183-193.

Ohmura H., Boscan P.L., Solano A.M., Stanley S.D., Jones J.H., 2012.

Changes in heart rate, heart rate variability, and atrioventricular block during withholding of food in thoroughbreds. *American Journal of Veterinary Research* 73, 508-514.

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

Equine Cushing's disease: plasma immunoreactive proopiomelanocortin peptide and cortisol levels basally and in response to diagnostic tests. *Endocrinology* 110, 1430-1441.

Orth D.N., Kovacs J., 1998.

The adrenal cortex. In: Wilson D., Foster D.W., Kronenberg H.M., Reed Larsen P., B.: *Williams textbook of endocrinology*, 9.Auflage, W.B. Saunders Co, Philadelphia, 517-664.

Perkins G.A., Lamb S., Erb H.N., Schanbacher B., Nydam D.V., Divers T.J., 2002.

Plasma adrenocorticotropin (ACTH) concentrations and clinical response in horses treated for equine Cushing's disease with cyproheptadine or pergolide. *Equine Veterinary Journal* 34, 679-685.

- Pieters G.F.F.M., Smals A.G.H., Benraad T.J., 1979.
Plasma cortisol response to TRF and LHRF in Cushing's disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 48, 361-368.
- Place N.J., McGowan C.M., Lamb S.V., Schanbacher B.J., McGowan T., Walsh D.M., 2010.
Seasonal variation in serum concentrations of selected metabolic hormones in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24, 650-654.
- Pongratz M.C., Graubner C., Eser M.W., 2010.
Equine Cushing Syndrom- Wirkung einer Langzeittherapie mit Pergolid. *Pferdeheilkunde* 26, 598-603.
- Raffin-Sanson M.L., de Keyser Y., Bertagna X., 2003.
Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: from physiology to pathological conditions. *European Journal of Endocrinology* 149, 79-90.
- Ramirez S., McClure J.J., Moore R.M., Wolfsheimer K.J., Gaunt S.D., Mirza M.H., Taylor W., 1998.
Hyperthyroidism associated with a thyroid adenocarcinoma in a 21-year-old gelding. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 12, 475-477.
- Rapson J.L., Schott H.C., Nielsen B.D., McCutcheon L.J., Harris P.A., Geor R.J., 2018.
Effects of age and diet on glucose and insulin dynamics in the horse. *Equine Veterinary Journal* 50, 690-696.
- Rask E., Olsson T., Söderberg S., Andrew R., Livingstone D.E., Johnson O., Walker B.R., 2001.
Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86, 1418-1421.
- Rasouli N., Kern P.A., 2008.
Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93, 64-73.
- Rathmann M., Rijkenhuizen A.B.M., 2012.
Ultrasonography of the upper cervical region (EUCR) in the horse. *Pferdeheilkunde* 28, 575-582.
- Reef V.B., Bonagura J., Buhl R., McGurrin M.K., Schwarzwald C.C., van Loon G., Young L.E., 2014.
Recommendations for management of equine athletes with cardiovascular abnormalities. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28, 749-761.

- Restifo M.M., Frank N., Hermida P., Sanchez-Londono 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, 738-748.
- Rothuizen J., Reul J.M., van Sluijs F.J., Mol J.A., Rijnberk A., de Kloet E.R., 1993.
Increased neuroendocrine reactivity and decreased brain mineralocorticoid receptor-binding capacity in aged dogs. *Endocrinology* 132, 161-168.
- Saiardi A., Borrelli E., 1998.
Absence of dopaminergic control on melanotrophs leads to Cushing's-like syndrome in mice. *Molecular endocrinology* 12, 1133-1139.
- Saland L.C., 2001
The mammalian pituitary intermediate lobe: an update on innervation and regulation. *Brain Research Bulletin* 54, 587-593.
- Schmidt P., Dahme E., 2007.
Organe der inneren Sekretion (endokrines System). In: Dahme E., Weiss E., B.: *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*, 6. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, 333-354.
- Schnorr B., Kressin M., 2006.
Entwicklung der endokrinen Drüsen. In: B.: *Embryologie der Haustiere*, 5. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, 140-142.
- Schoster A., 2017.
Katheter-assoziierte Komplikationen bei Pferden. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 159, 477-485.
- Schorn C., 2019.
TRH-Stimulationstests bei an PPID erkrankten Pferden und Ponys sowie kurz- und langfristige Effekte der Pergolidtherapie. *Veterinärmedizin Dissertation JLU Gießen*.
- Schott H.C., 2002.
Pituitary pars intermedia dysfunction: equine Cushing's disease. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 18, 237-270.
- Schott H.C., Coursen C.L., Eberhart S.W., Nachreiner R.J., Refsal K.R., Ewart S.L., Marteniuk J.V., 2001.
The michigan cushing's project. *Proceedings of the 47th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 22-24

- Schuver A., Frank N., Chameroy K.A., Elliott S.B., 2014.
Assessment of insulin and glucose dynamics by using an oral sugar test in horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 34, 465-470.
- Sojka J.E., 1995.
Hypothyroidism in horses. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian* 17, 845-852.
- Sojka J.E., Johnson M.A., Bottoms G.D., 1993.
Serum triiodothyronine, total thyroxine, and free thyroxine concentrations in horses. *American Journal of Veterinary Research* 54, 52-55.
- Sommardahl C.S., Frank N., Elliott S.B., Webb L.L., Refsal K.R., Denhart J.W., Thompson D.L., 2005.
Effects of oral administration of levothyroxine sodium on serum concentrations of thyroid gland hormones and responses to injections of thyrotropin-releasing hormone in healthy adult mares. *American Journal of Veterinary Research* 66, 1025-1031.
- Ssewanyana E., Lincoln G.A., Linton E.A., Lowry P.J., 1990.
Regulation of the seasonal cycle of beta-endorphin and ACTH secretion into the peripheral blood of rams. *Journal of Endocrinology* 124, 443-454.
- Stull C.L., Rodiek A.V., 1988.
Responses of blood glucose, insulin and cortisol concentrations to common equine diets. *Journal of Nutrition* 118, 206-213.
- Stull C.L., Rodiek A.V., 1995.
Stress and glycemic responses to postprandial interval and feed components in exercising horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 15, 382-386.
- Surwit R.S., Kuhn C.M., Cochrane C., McCubbin J.A., Feinglos M.N., 1988.
Diet-induced type II diabetes in C57Bl/6J mice. *Diabetes* 37, 1163-1167.
- Tan R.H., Davies S.E., Crisman M.V., Coyle L., Daniel G.B., 2008.
Propylthiouracil for treatment of hyperthyroidism in a horse. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22, 1253-1258.
- Thompson J.C., Ellison R., Gillett R., Badcoe L., 1995.
Problems in the diagnosis of pituitary adenoma (Cushing's syndrome) in horses. *New Zealand Veterinary Journal* 43, 79-82.
- Thompson D.L., Valencia N.A., 2017.
Thyrotropin-Releasing Hormone: A Powerful Tripeptide With Diverse Effects in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 59, 7-13.

- Tóth F., Frank N., Geor R.J., Boston R.C., 2010.
Effects of pretreatment with dexamethasone or levothyroxine sodium on endotoxin-induced alterations in glucose and insulin dynamics in horses. *American Journal of Veterinary Research* 71, 60-68.
- van der Kolk J.H., 1998.
Diseases of the pituitary gland, including hyperadrenocorticism. In: Watson T.D., B.: *Metabolic and endocrine problems of the horse*, WB Saunders, London, 41-59.
- van der Kolk J.H., Fouché N., Gross J.J., Gerber V., Bruckmaier R.M., 2016.
A comparison between the equine and bovine hypothalamus-pituitary-adrenocortical axis. *Domestic Animal Endocrinology* 56, 101-111.
- van der Kolk J.H., Kalsbeek H.C., van Garderen E., Wensing T., Breukink H.J., 1993.
Equine pituitary neoplasia: a clinical report of 21 cases (1990-1992). *Veterinary Record* 133, 594-597.
- Verkerk G.A., Macmillan K.L., McLeay L.M., 1994.
Adrenal cortex response to adrenocorticotrophic hormone in dairy cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 11, 115-123.
- Vick M.M., Adams A.A., Murphy B.A., Sessions D.R., Horohov D.W., Cook R.F., Shelton B.J., Fitzgerald B.P., 2007.
Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. *Journal of Animal Science* 85, 1144-1155.
- Walker B.R., Best R., Noon J.P., Watt G.C., Webb D.J., 1997.
Seasonal variation in glucocorticoid activity in healthy men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82, 4015-4019.
- Wilkinson C.W., 2006.
Roles of acetylation and other post-translational modifications in melanocortin function and interactions with endorphins. *Peptides* 27, 453-471.
- Wilson M.G., Nicholson W.E., Holscher M.A., Sherrell B.J., Mount C.D., Orth D.N., 1982.
Proopiomelanocortin peptides in normal pituitary, pituitary tumor, and plasma of normal and Cushing's horses. *Endocrinology* 110, 941-954.
- Yamaguchi H., Aiba A., Nakamura K., Nakao K., Sakagami H., Goto K., Kondo H., Katsuki M., 1996.
Dopamine D2 receptor plays a critical role in cell proliferation and proopiomelanocortin expression in the pituitary. *Genes to Cells* 1, 253-268.

Zhao S., Chu Y., Zhang C., Lin Y., Xu K., Yang P., Fan J., Liu E., 2008.
Diet-induced central obesity and insulin resistance in rabbits. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 92, 105-111.

8 Anhang

8.1 Kennzahlen der analytischen Tests

Alle folgenden Angaben stammen von den Herstellern der Analysegeräte:

Siemens Healthcare Diagnostics GmbH/Eschborn:

Immulinite® 2000 ACTH (PIL2KAC-17, 2015-07-16)

Immulinite® 2000 Canine Total T4 (PIL2KCT-15, 2016-12-16)

ADVIA Centaur® Cortisol Assay (10994987_DE Rev. B, 2014-10)

ADVIA Centaur® Insulin Assay (10629880_DE Rev. M, 2014-08)

Roche Diagnostics GmbH/Mannheim:

cobas® e 801 Elecsys FT3 III (2018-01, V 2.0 Deutsch)

cobas® e 801 Elecsys FT4 II (2018-01, V 2.0 Deutsch)

8.1.1 Immulinite® 2000 ACTH

Messbereich: bis 1250 µg/ml

Analytische Sensitivität: 5 pg/ml

Intra-Assay-Präzision (pg/ml):

Statistische Erhebung anhand der Ergebnisse von 20 Wiederholungsmessungen für 5 Proben.

	Mittelwert	SD	Variationskoeffizient (VK)
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 %

Inter-Assay-Präzision (pg/ml):

Statistische Erhebung anhand der Ergebnisse von 8 Durchgängen für 5 Proben.

	Mittelwert	SD	Variationskoeffizient (VK)
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 %

Spezifität:

Verbindung	pg/ml hinzugefügt	% Kreuzreaktivität
ACTH (1 – 18)	500	ND
	5000	ND
	50000	ND
	500000	ND
ACTH (1 – 24)	500	1,0 %
	5000	0,5 %
	50000	0,2 %
	500000	ND
ACTH (18 – 39)	500	17,3 %
	5000	16,6 %
Alpha MSH	500	ND
	5000	0,1 %
	50000	ND
	500000	ND

ND: not detectable

Interferenzen:

Das Vorhandensein der folgenden Stoffe hat innerhalb der Genauigkeit des Assay keinen Einfluss auf die Ergebnisse.

Vorhandener Stoff	Konzentration
Bilirubin (konjugiert und unkonjugiert)	bis 200 mg/l
Hämoglobin	bis 512 mg/dl
Triglyzeride	bis 5000 mg/dl

Der Methodenvergleich des Immulite® 2000 mit dem Immulite®, anhand der Messung von 86 Proben ergab einen linearen Zusammenhang:

$$(IML\ 2000) = 0,95 (IML) + 2,9\ \mu\text{g/ml};\ r = 0,988$$

Validierung für das Pferd:

Immulite®: Perkins et al. (2002)

Immulite® 2000: Köller et al. (2016)

8.1.2 Immulite® 2000 Canine Total T4

Messbereich: 0,5 – 15 µg/dl (6,4 – 193 nmol/l)

Sensitivität: 0,12 µg/dl (1,5 nmol/l)

Präzision:

2 Läufe pro Tag in Doppelbestimmung, jeweils über 20 Tage (n = 80).

	MW (µg/dl)	Intra-Assay		Gesamt	
		SD (µg/dl)	VK (%)	SD (µg/dl)	VK (%)
1	0,68	0,04	5,9	0,06	8,8
2	1,5	0,07	4,7	0,10	6,7
3	5,8	0,23	4,0	0,48	8,3
4	9,0	0,33	3,7	0,98	10,9
5	11,4	0,60	5,3	1,45	12,7

Spezifität:

Verbindung	µg/dl hinzugefügt	Wiederfindung (µg/dl)	% Kreuz- reaktivität
D-Thyroxin	10	7,9	79 %
Tetraiodthyroessigsäure	10	5,4	54 %
Triiod-L-Thyronin	100	1,7	1,8 %
	25	0,25	1,0 %
Triiod-D-Thyronin	1	ND	ND
Triiodthyroessigsäure	1000	15,5	1,6 %
	10	ND	ND
Monoiodthyrosin	1000	ND	ND
	10	ND	ND
Diiod-L-Tyrosin	1000	ND	ND
Methimazol	1000	ND	ND
5,5-Diphenylhydantoin	1000	ND	ND
Phenylbutazon	1000	ND	ND
6-n-Propyl-2-Thiouracil	1000	ND	ND

ND: not detectable

8.1.3 ADVIA Centaur® Cortisol Assay

Analytischer Messbereich: 0,50 – 75 µg/dl (13,80 – 2069 nmol/l)

Nachweisgrenze: 0,14 µg/dl (3,9 nmol/l)

Präzision:

MW (µg/dl)	MW (µmol/l)	Reproduzierbarkeit (% VK)	Laborintern (% VK)
2,76	76,2	3,7	6,0
5,69	157,0	3,3	5,3
22,28	614,7	2,9	4,5
34,24	944,7	3,4	4,4
50,51	1393,6	4,2	4,9

Interferenzen:

Folgende Serum- proben...	Haben signifikante Wirkung auf den Assay bis...
hämolytisch	500 mg/dl Hämoglobin
lipämisch	1170 mg/dl Triglyzeride
ikterisch	20 mg/dl Bilirubin

Spezifität:

Die Kreuzreaktivität durch strukturell verwandte Verbindungen und Pharmazeutika wurde durch ein Spiking jeder Verbindung in getrennte Humanserumproben auf eine endgültige Konzentration von 1000 µg/dl (27.590 nmol/l) bestimmt, sofern nicht anders vermerkt.

% Kreuzreaktivität (KR)

$$= \frac{\text{Cortisol in gespikter Probe, } \mu\text{g/dl} - \text{Cortisol in nicht gespikter Probe, } \mu\text{g/dl}}{\text{hinzugefügte Konzentration der Verbindung, } \mu\text{g/dl}} \times 100$$

Verbindung	% KR	Verbindung	% KR
<i>Endogene Steroide</i>		<i>Endogene Steroide</i>	
Aldosteron	≤ 0,5	11β-Hydroxyprogesteron	≤ 2
Allotetrahydrocortisol (100 µg/dl)	≤ 15	17α-Hydroxyprogesteron	≤ 2
Androstendion	≤ 0,3	17α-Hydroxypregnenolon	≤ 0,3
Corticosteron	≤ 6	11-Ketoandrosteron	≤ 0,1
Kortison (100 µg/dl)	≤ 35	11-Ketoetiocholanolon	≤ 2
α-Kortol	≤ 0,8	Pregnantriol	≤ 0,1
α-Kortolon	≤ 0,1	Pregnenolon	≤ 0,5
β-Kortol	≤ 0,1	Progesteron	≤ 1
β-Kortolon	≤ 0,1	Spironolacton	≤ 0,1
Dehydrocorticosteron	≤ 4	Testosteron	≤ 0,4
11-Deoxycorticosteron	≤ 2	Tetrahydrocortisol	≤ 2
11-Deoxycortisol (100 µg/dl)	≤ 25	Tetrahydrocortison	≤ 0,8
21-Deoxycortisol (100 µg/dl)	≤ 15	Tetrahydro-11-Deoxycortisol	≤ 1
20α-Dihydrocortisol	≤ 4		
20β-Dihydrocortisol	≤ 4	<i>Synthetische Steroide</i>	
20α-Dihydrocortison	≤ 1	Prednisolon (50 µg/dl)	≥ 120
20β-Dihydrocortison	≤ 0,5	6-Methylprednisolon (100 µg/dl)	≤ 30
11β-Hydroxyandrosteron	≤ 0,1	Dexamethason	≤ 1
6β-Hydroxycortisol	≤ 8	Prednison (100 µg/dl)	≤ 35
11β-Hydroxyetiocholanolon	≤ 0,1	Canrenon	≤ 0,5

8.1.4 ADVIA Centaur® Insulin Assay

Analytischer Messbereich: 0,5 – 300 mU/l

Spezifität:

Die Kreuzreaktivität wurde durch ein Spiking der Serumproben mit den folgenden Verbindungen und den angegebenen Konzentrationen bestimmt. Diese Verbindungen haben keinen wesentlichen Einfluss auf die Insulin-Messung.

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

Präzision:

Drei Proben wurden 2 Mal, in 3 Durchläufen, auf 3 Systemen (n = 72 für jede Probe), über einen Zeitraum von 4 Tagen getestet. Es wurden die folgenden Ergebnisse erzielt.

Mittlerer Insulinwert (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 %

Interferenzen:

Folgende Serumproben...	Weisen eine Änderung von ≤ 6 % auf, die zu folgenden Ergebnissen führen kann...
Hämolytisch	125 mg/dl Hämoglobin
Lipämisch	1000 mg/dl Lipid
Ikterisch	20 mg/dl Bilirubin
Proteinämisch	12 g/dl Protein

8.1.5 cobas® Elecsys FT3 III

Messbereich: 0,6 – 50 pmol/l

Bestimmungsgrenze: 1,5 pmol/l

Präzision:

2 Läufe pro Tag in Doppelbestimmung, jeweils über 21 Tage (n = 84).

Probe	MW (pmol/l)	Wiederholpräzision		Zwischenpräzision	
		SD (pmol/l)	VK (%)	SD (pmol/l)	VK (%)
1	1,47	0,111	7,6	0,122	8,3
2	3,22	0,113	3,5	0,116	3,6
3	6,89	0,147	2,1	0,172	2,5
4	26,9	0,460	1,7	0,472	1,8
5	49,0	0,689	1,4	0,806	1,6

Spezifität:

Getestet mit fT3 Konzentrationen von circa 3,30 pmol/l (2,15 pg/ml) und 13,1 pmol/l (8,53 pg/ml) wurden folgende Kreuzreaktionen ermittelt.

Verbindung	Getestete Konzentration (pg/ml)	KR %
L-T4	300000	0,008
D-T4	625000	0,005
rT3	10000000	0,000
3-Iod-L-Tyrosin	100000000	0,000
3,5-Diiod-L-Tyrosin	100000000	0,000
3,3',5-Triiodthyroessigsäure	6250	0,282
3,3',5,5'-Tetraiodthyro-essigsäure	1000000	0,0002

KR = Kreuzreaktivität

Interferenzen:

Es wurde kein Einfluss auf die Ergebnisse durch Interferenzen bis zu den aufgeführten Konzentrationen festgestellt.

Endogene Substanz	Getestete Konzentration
Bilirubin	$\leq 1128 \mu\text{mol/l}$ bzw. $\leq 66 \text{ mg/dl}$
Hämoglobin	$\leq 0,621 \text{ mmol/l}$ bzw. $\leq 1000 \text{ mg/dl}$

8.1.6 cobas® Elecsys FT4 II

Messbereich: 0,5 – 100 pmol/l

Bestimmungsgrenze: 1,3 pmol/l

Präzision:

2 Läufe pro Tag in Doppelbestimmung, jeweils über 21 Tage (n = 84).

Probe	MW (pmol/l)	Wiederholpräzision SD (pmol/l)	VK (%)	Zwischenpräzision SD (pmol/l)	VK (%)
1	1,80	0,095	5,3	0,252	14,0
2	12,8	0,194	1,5	0,452	3,5
3	21,7	0,360	1,7	0,754	3,5
4	46,3	0,803	1,7	1,79	3,9
5	87,9	2,13	2,4	4,26	4,8

Spezifität:

Getestet mit fT4 Konzentrationen von circa 12,5 pmol/l (0,97 ng/dl) und 34,0 pmol/l (2,64 ng/dl) wurden folgende Kreuzreaktionen ermittelt.

Verbindung	Getestete Konzentration (pg/ml)	KR %
L-T4	50000	0,006
D-T4	50000	0,002
rT3	190000	0,0003
3-Iod-L-Tyrosin	10000000	0,0000
3,5-Diiod-L-Tyrosin	10000000	0,0000
3,3',5-Triiodthyroessigsäure	100000	0,0000
3,3',5,5'-Tetraiodthyro- essigsäure	100000	0,0001

KR = Kreuzreaktivität

Interferenzen:

Es wurde kein Einfluss auf die Ergebnisse durch Interferenzen bis zu den aufgeführten Konzentrationen festgestellt.

Endogene Substanz	Getestete Konzentration
Bilirubin	$\leq 701 \mu\text{mol/l}$ bzw. $\leq 41 \text{ mg/dl}$
Hämoglobin	$\leq 0,621 \text{ mmol/l}$ bzw. $\leq 1000 \text{ mg/dl}$

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Zellen und Hormone der Pars distalis der Adenohypophyse	5
Tab. 2:	Releasingfaktoren (RF) und Inhibitingfaktoren (IF) des Hypothalamus mit den jeweiligen Zielhormonen der Adenohypophyse	6
Tab. 3:	Sensitivität (Sens.) und Spezifität (Spez.) des TRH-Stimulationstests (TRH-Stim.) im Vergleich zu anderen Tests zur PPID Diagnostik (nach Schorn 2019)	14
Tab. 4:	Reihenfolge der randomisierten Verabreichung der beiden TRH- Dosierungen ($\mu\text{g/kg}$ KGW) bei den 11 Probanden	22
Tab. 5:	Laboreigene ACTH-Referenzbereiche von Biocontrol (pg/ml) für den Einschluss in die Studie.....	25
Tab. 6:	Scoring-System zur Erfassung der Symptome in den ersten 15 Minuten nach TRH-Injektion	29
Tab. 7:	Analysezeitpunkte für die jeweiligen Blutparameter	31
Tab. 8:	Probandencharakteristika	40
Tab. 9:	ACTH-Konzentrationen und Ergebnisse der Dexamethason- Suppressionstests bei allen Probanden ≥ 15 Jahren in der Voruntersuchung	42
Tab. 10:	Ergebnis der Varianzanalysen zum Einfluss der TRH-Dosierungen	43
Tab. 11:	Individuelle ACTH-Werte 10 und 30 Minuten nach TRH-Stimulation.	59
Tab. 12:	Betrag der Differenz zwischen den Insulin-Ausgangswerten (in pmol/l) zum Zeitpunkt 0 vor Stimulation mit 1 bzw. 2 $\mu\text{g/kg}$ TRH für alle elf Probanden.....	67
Tab. 13:	Insulin (pmol/l) vor Heugabe (Insulin _{no}), vor Stimulation mit TRH (0 Minuten) und Schwankungsbreite über die folgenden 90 Minuten (6 Messungen).....	68
Tab. 14:	AUCs für T4, fT4 und fT3 nach 1 bzw. 2 $\mu\text{g/kg}$ TRH. MW $\pm$ SD (range), n = 8.....	71
Tab. 15:	Zeitpunkt des Auftretens der Minimal- bzw. Maximalkonzentration des T4 – untergliedert nach verwendeter TRH-Dosis.....	73
Tab. 16:	Zeitpunkt des Auftretens der Minimal- bzw. Maximalkonzentration des fT4 – untergliedert nach verwendeter TRH-Dosis	75
Tab. 17:	Zeitpunkt des Auftretens der Minimal- bzw. Maximalkonzentration des fT3 – untergliedert nach verwendeter TRH-Dosis	78
Tab. 18:	Fütterungseinfluss auf die Hormon- und Glukosekonzentration	81
Tab. 19:	Zusammenhänge zwischen Body Condition Score und Laborparametern	87
Tab. 20:	Vergleich der derzeitigen (2020) Kosten verschiedener Labortests zur Diagnostik einer PPID.....	101
Tab. 21:	Faktorielle Anstiege 2 Stunden (fT3) bzw. 4 Stunden (T4, fT4) nach TRH Mittelwert (Minimum – Maximum).....	116

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schema der enzymatischen Verstoffwechslung von Glukose in Anwesenheit von Hexokinase (1) und Glukose-6-Phosphat-dehydrogenase (2).	35
Abb. 2:	Redoxreaktion an der Elektrode um Chemilumineszenz auszulösen, die zur Bestimmung der Konzentrationen von fT4 bzw. fT3 genutzt wird	37
Abb. 3:	Reaktionsprinzip des kompetitiven Immunoassay im cobas® 8000 modular analyzer series.	38
Abb. 4:	ACTH-Verlauf der Probanden 1, 2, 4 und 11 nach Injektion von 0,9 %iger NaCl als Placebo zum Zeitpunkt 0	44
Abb. 5:	Cortisol-Verlauf der Probanden 1, 2, 4 und 11 nach Injektion von 0,9 %iger NaCl als Placebo zum Zeitpunkt 0	45
Abb. 6:	Verlauf von T4 (Darstellung als Stern) und fT4 (Darstellung als Kreis) der Probanden 1, 2, 4 und 11 nach Injektion von 0,9 %iger NaCl als Placebo zum Zeitpunkt 0	46
Abb. 7:	ft3-Verlauf der Probanden 1, 2, 4 und 11 nach Injektion von 0,9 %iger NaCl als Placebo zum Zeitpunkt 0	47
Abb. 8:	ACTH AUCs aller Probanden nach beiden TRH-Dosierungen	49
Abb. 9:	Individueller prozentualer Unterschied der ACTH AUCs nach 2 µg/kg TRH (entspricht 0%) im Vergleich zu 1 µg/kg TRH	50
Abb. 10:	ACTH-Verlauf aller Probanden nach Stimulation mit TRH zum Zeitpunkt 0	51
Abb. 11:	Sehr ähnliche ACTH-Peaks nach beiden TRH-Dosierungen bei Proband 2 und 6	53
Abb. 12:	Sehr ähnliche ACTH-Peaks nach beiden TRH-Dosierungen bei Proband 9 und 10	54
Abb. 13:	Höherer ACTH-Peak nach 2 µg/kg TRH bei Proband 3 und 4	55
Abb. 14:	Höherer ACTH-Peak nach 2 µg/kg TRH bei Proband 7 und 8	56
Abb. 15:	Höherer ACTH-Peak nach 1 µg/kg KGW bei Proband 1 und 5	57
Abb. 16:	Höherer ACTH-Peak nach 1 µg/kg TRH bei Proband 11	58
Abb. 17:	Cortisol AUCs aller Probanden nach beiden TRH-Dosierungen	61
Abb. 18:	ACTH AUC (pg/ml x 90 min) und Cortisol AUC (nmol/l x 90 min) nach beiden TRH-Dosierungen (1 und 2 µg/kg TRH)	63
Abb. 19:	Cortisol-Verlauf aller Probanden nach Stimulation mit TRH zum Zeitpunkt 0	64
Abb. 20:	Insulin AUCs aller Probanden nach beiden TRH-Dosierungen	66
Abb. 21:	Glukose AUCs aller Probanden nach beiden TRH-Dosierungen	69
Abb. 22:	T4 AUCs der Probanden 4 – 11 nach beiden TRH-Dosierungen	72
Abb. 23:	fT4 AUCs der Probanden 4 – 11 nach beiden TRH-Dosierungen	74
Abb. 24:	fT3 AUCs der Probanden 4 – 11 nach beiden TRH-Dosierungen	77
Abb. 25:	Verlauf der Schilddrüsenhormone der Probanden 4 – 11 nach Stimulation mit 2 µg/kg TRH zum Zeitpunkt 0 Minuten	79
Abb. 26:	Unerwünschte Symptome nach TRH-Applikation	80
Abb. 27:	Insulinkonzentration vor und nach Raufutteraufnahme aller 11 Probanden	82

Abb. 28: Glukosekonzentration vor und nach Raufutteraufnahme aller 11 Probanden.	83
Abb. 29: fT4-Konzentration vor und nach Raufutteraufnahme aller 11 Probanden.	84
Abb. 30: fT3-Konzentration vor und nach Raufutteraufnahme aller 11 Probanden.	85
Abb. 31: T4-Konzentration vor und nach Raufutteraufnahme aller 11 Probanden.	86
Abb. 32: Korrelation zwischen Insulin AUC und BCS aller 11 Probanden, dargestellt für beide TRH-Dosierungen.	88
Abb. 33: Korrelation zwischen Cortisol AUC und BCS aller 11 Probanden, dargestellt für beide TRH-Dosierungen.	89



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: 978-3-8359-6874-5



9 783835 196874 5

