

# Untersuchungen zum Knochen-Isoenzym der Alkalischen Phosphatase im Serum von gesunden Pferden

F. Nitzschke und M. Fürll

Medizinische Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig

## Zusammenfassung

An gesunden Pferden der Rassen Englisches Vollblut sowie Deutsches Reitpferd wurden in den Altersgruppen < 2, 3–5, 6–9, 12–18, 24, 36 sowie >36 Monate die Gesamtaktivität (APT), das Knochenisoenzym (APB) der Alkalischen Phosphatase, die Ca- sowie die Pi-Konzentrationen im Blutserum bestimmt. Für die Messung der APB wurde ein semiautomatisierbarer Test der Fa Boehringer, Mannheim, verwendet. Die Differenz APT-APB im Blut entspricht weitgehend der Aktivität des AP-Leber-Isoenzymes (APL). Bei Fohlen stellt die APB mit 250–2000 U/l (74,7 %) den Hauptanteil der APT (500–2600 U/l). Dieser Anteil fällt mit zunehmendem Alter stetig ab und beträgt bei Adulten nur noch 26 % (60–120 U/l). Die Pi-Konzentration korreliert signifikant mit den APT- und APB-Aktivitäten. Rasseunterschiede wurden nicht ermittelt.

**Schlüsselwörter:** Pferd, alkalische Phosphatase, Blutserum, Knochen

## Investigations on bone alkaline phosphatase isoenzyme in healthy horses

The total alkaline phosphatase (APT), bone isoenzyme (APB), Ca and Pi were measured in Thoroughbred and German Riding Horses of age groups < 2, 3–5, 6–9, 12–18, 24, 36 and > 36 months in blood serum. A semiautomated assay was used for the determination of APB of the firm Boehringer, Mannheim. The difference APT-APB meets approximately with AP liver isoenzyme (APL). The APB (250–2000 U/l) forms with 74,7 % the main part of APT (500–2600 U/l) in foals. This share decreases continuously with growing age and is in adults only 26 % (60–120 U/l). APL (120–300 U/l) did not significantly differ in the age groups. Pi concentration correlated significantly with APT and APB activities. Breed differences we did not found.

**keywords:** horse, alkaline phosphatase, blood serum, bone

## Einleitung und Problemstellung

Die Alkalische Phosphatase (AP) gehört zu den am längsten in die klinische Labordiagnostik eingeführten Enzymen. Sie wird vor allem für die Erkennung von Knochenstoffwechselstörungen bei Jungtieren genutzt. Wie bei keinem anderen Enzym variieren aber in den Literaturberichten die Angaben zu physiologischen Aktivitäten. Gründe dafür sind in den methodischen Differenzen bei der Analytik (verschiedene Puffer: Piperazin, Diäthanolamin; Meßtemperaturen: 25° C, 30° C, 37° C) sowie in den altersabhängig variierenden Isoenzymen der AP zu suchen.

Für die AP sind Isoenzyme im Knochen, in der Leber, den Gallengängen, den Nieren, in der Plazenta, der Darmmukosa, der laktierenden Milchdrüse und in den Leukozyten nachgewiesen worden (Thorén-Tolling 1988a, Islas et al. 1992, Hank et al. 1993). Gewebsspezifische posttranslationale Veränderungen der AP-Isoenzyme bedingen eine unterschiedliche Migrationsgeschwindigkeit im elektrischen Feld sowie ein differenziertes Verhalten gegenüber chemischen und thermischen Einwir-

kungen. Mit Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und Wärmeeinwirkung (Dumas und Spano 1980) sowie Agarose-Gel-Elektrophorese und gleichzeitiger thermischer bzw. chemischer Hemmung mit L-Phenylalanin oder Levamisol (Thorén-Tolling 1988a) konnten bei Pferden verschiedene Isoenzyme in Geweben und Blutserum isoliert werden. Unter physiologischen Bedingungen werden im Blutserum von Pferden jedoch nur 2 Isoenzyme gefunden: das Leber- (APL) und das Knochen- (APB) Isoenzym. Bei trächtigen Stuten kann außerdem zeitweilig noch eine dritte Fraktion, das Plazenta-Isoenzym, nachgewiesen werden (Dumas und Spano 1980, Thorén-Tolling 1988b, Rudolph et al. 1994). Außerdem ist bei Pferden mit granulomatöser Gastroenteritis ein Gallengangs-Isoenzym nachgewiesen worden. Die elektrophoretischen Verfahren sind relativ zeitaufwendig und ermöglichen nur eine semiquantitative Isoenzym-Erfassung. Die spezifische Präzipitation des APB mit Weizenkeimlektin ermöglicht in humanem Serum (Rosalki und Ying Foo 1984, Behr und Barnert 1986) auf schnelle und einfache

Weise auch eine quantitative Bestimmung dieses Isoenzymes, so daß dieses Verfahren in der Humanmedizin heute zur Routinediagnostik gehört. Auch für das Rind konnte dessen diagnostische Nutzbarkeit nachgewiesen werden (Fürll und Knyrim 1993). Untersuchungen von Hank et al. (1993) zeigten, daß das APB beim Pferd ebenfalls mit Lektin reagiert und es keine Interferenzen mit anderen Isoenzymen gibt. Die optimalen Inkubationszeiten sowie die Lektin-Konzentrationen im Fällungsreagenz entsprechen denen für humanes Serum.

Aufbauend auf der von Hank et al. (1993) nachgewiesenen prinzipiellen Eignung dieses Testverfahrens zum quantitativen APB-Nachweis wurden nachfolgende Untersuchungen mit folgender Zielstellung durchgeführt:

- getrennte Bestimmung der APT und der APB im Serum gesunder Pferde unter Beachtung alters- sowie möglicher rassebedingter Differenzen
- Bestimmung von Referenzwerten

### Eigene Untersuchungen

#### Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an klinisch gesunden Pferden der Rassen Englisches Vollblut sowie Deutsches Reitpferd bei folgenden Altersgruppen sowie Tierzahlen (n) durchgeführt:

Monate	< 2	3-5	6-9	12-18	24	36	> 36
Englisches Vollblut n	12	12	12	20	8	13	69
Deutsches Reitpferd n	12	12	12	20	-	-	-

Die Pferde standen in drei Beständen. Die jeweils 12 Fohlen wurden im Verlauf kontrolliert.

Vor jeder Blutentnahme aus der V. jugularis erfolgte eine klinische Untersuchung der Tiere.

Das gewonnene Blut wurde innerhalb von 4 Stunden zentrifugiert (10000 g) und die klinisch-chemischen Parameter am selben Tag mit dem Hitachi-704-Analysenautomaten bei 37° C unter Verwendung von Reagenzien der Fa. Boehringer, Mannheim, analysiert. Folgende Bestimmungsmethoden kamen zum Einsatz:

- Alkalische Phosphatase: opt. Standardmethode der deutschen Gesellschaft für Klin. Chemie, kinetische Messung mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat
- anorg. Phosphat (Pi): Komplexbildung mit Molybdatonen
- Calcium: o-Kresolphthalein-Komplexon

Für die Bestimmung der APB wurde die Testkombination „Isoenzyme der alkalischen Phosphatase“ (Boehringer, Mannheim) verwendet (2g/ l Lektin; Acetatpuffer: 5 mmol/l , pH 4,5). 0,1 ml Serum wurden mit 0,1 ml Fällungsreagenz gemischt, 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen, anschließend bei 10000 g 2,5 Minuten zentrifugiert und der Überstand zur Messung der Restaktivität am Hitachi 704 verwendet. Die Aktivität der APB wurde aus der APT minus der AP-Restaktivität rechnerisch ermittelt. Neben den genannten Kriterien erfolgte die Bestimmung der Leukozytenzahl, des Erythrogrammes sowie weiterer Serumenzyme und -metaboliten, die die Pferde als gesund auswiesen. Die biostatistische Auswertung erfolgte varianzanalytisch mit nachfolgendem multiplen Mittelwertvergleich (Studentisierter Newman-Keuls-Test/  $p < 0,05$ ) sowie Korrelationsrechnung.

#### Ergebnisse

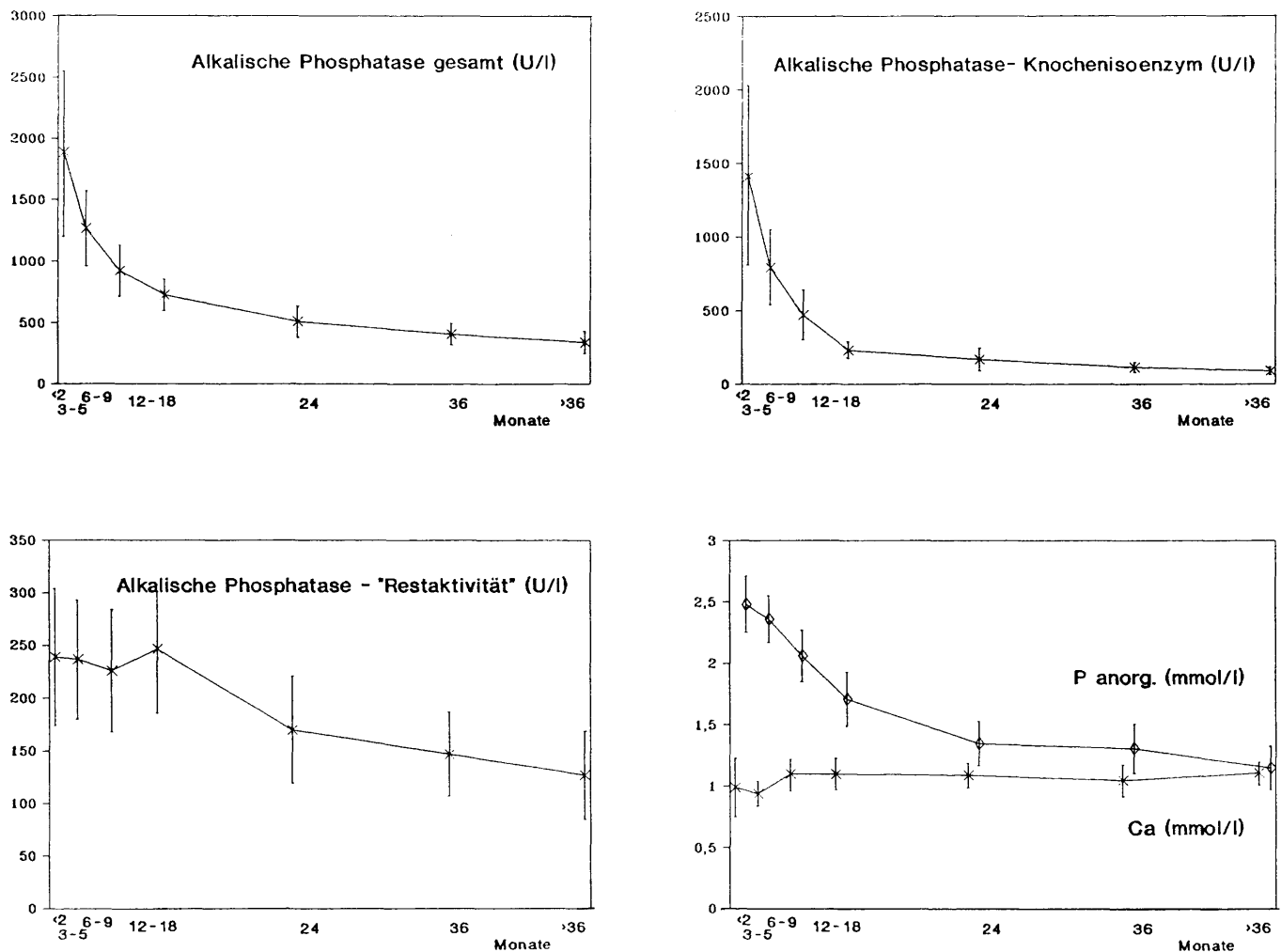
Die in 10fach-Bestimmungen ermittelten relativen Streuungen betragen für die APT 3,1 % und für die APB 3,9 %. Die Mittelwerte sowie Standardabweichungen ( $\bar{x} \pm s$ ) der APT, APB, der AP-Restaktivität, der Ca- und Pi-Konzentrationen sind in den Abb. 1 und 2 alters- und rasseabhängig dargestellt.

Aus Abb. 2 ist ersichtlich, daß zwischen den bei Englischen Vollblut- sowie Deutschen Reitpferden ermittelten Meßwerten der APT, APB, AP-Restaktivität sowie des Pi keine gesicherten Unterschiede bestehen. Bei den zusammengefaßten Meßwerten beider Rassen unterschieden sich die Aktivitäten der APT sowie der APB der Fohlen und Jährlinge gesichert gegenüber den 3 Gruppen Adulte. Auch zwischen Fohlen und Jährlingen bestanden gesicherte Differenzen. Die gemessenen Aktivitäten der APB betragen in den einzelnen Altersgruppen 74,7-, 62,6-, 51,0-, 31,9-, 33,1-, 27,9- und 26,0 % der APT. Die Pi-Konzentrationen fielen mit zunehmendem Lebensalter ab und waren zwischen den Altersgruppen signifikant verschieden, die des Ca differierten nicht gesichert. Mit  $r = 0,99$  korrelierten die APT und APB hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Beide standen weiterhin mit dem Pi mit  $r = 0,94$  bzw.  $r = 0,90$  in gesicherter Beziehung ( $p < 0,01$ ). Sie korrelierten jedoch nicht mit der AP-Restaktivität. Diese wies zum Pi eine gesicherte Beziehung ( $p < 0,05$ ) mit  $r = 0,86$  auf. Die Ca-Konzentration stand zu keinem der aufgeführten Parameter in gesicherter Beziehung.

Referenzwerte als obere und untere Kontroll- sowie Toleranzgrenzen ( $K_{O,U}$ ;  $T_{O,U}$ ) wurden nach Storm und Launer (1980) berechnet und sind in Tabelle 1 dargestellt.

#### Diskussion

Vorliegende Untersuchungen bestätigen mit der akzeptablen relativen Streuung sowie mit den ermittelten APB-Aktivitäten bei den untersuchten Pferden in Beziehung zur APT in Übereinstimmung mit Untersuchungsergebnissen von Hank et al. (1993) die praktische Nutzbarkeit der Lektinfällung zur quantitativen Bestimmung der APB beim Pferd. Da beim gesunden nichtträchtigen Pferd nur zwei Isoenzyme im der AP im Blut nachweisbar sind, entspricht die sogenannte „Restaktivität“, die nach Ausfällung der APB als Differenz zur ABT verbleibt, weitgehend der Aktivität des Leber-Isoenzym der AP (Hank et al. 1993). Bei Rindern wurden z.B. bei verschiedenen Stoffwechsellagen dementsprechend gesicherte Veränderungen



**Abb. 1:** Verhalten der Alkalischen Phosphatase sowie der Ca- und Pi-Konzentrationen im Serum von Pferden unterschiedlichen Alters  
 Course of alkaline phosphatase as well as levels of Ca and Pi in serum of horses of various age

**Tab. 1:** Referenzwerte für die APT und APB (U/l) im Serum von Pferden unterschiedlichen Alters  
 Reference values for APT and APB (U/l) in serum of horses of various age

Monate	< 2	3-5	6-9	12-18	24	36	> 36
APT $T_0$	2662	1616	1159	873	653	508	477
$K_0$	2210	1413	1921	775	553	432	360
$K_U$	1566	1112	825	680	463	384	324
$T_U$	1114	918	667	581	363	308	237
APB $T_0$	2114	1085	663	297	257	152	120
$K_0$	1703	915	551	253	213	129	94
$K_U$	1177	871	391	211	123	99	76
$T_U$	706	501	279	167	79	76	58

gen der Restaktivität im Sinne der APL gemessen (Fürll und Knyrim 1993). Besonders bei Ponys mit ihrer Neigung zur Entwicklung von Hyperlipidämien findet man häufig Aktivitäts-

steigerungen der APT, die auf den Schweregrad der Leberveränderungen hinweisen und als prognostisches Kriterium genutzt werden (Fürll und Schäfer 1992). Die Bewertung der Rest-Aktivität der AP nach Lektinausfällung als APL beim Pferd bedarf aber weiterer Abklärung.

Die ausgeprägte Altersabhängigkeit der AP ist ein Charakteristikum dieses Enzyms bei allen Säugetieren. Für das neugeborene Fohlen wurde diskutiert, ob die Kolostrumaufnahme über eine Pinozytose der in der Milch vorkommenden AP zu einem Anstieg im Fohlenserum führt. Es wurde aber belegt, daß die im Blutserum bei Fohlen vorkommende AP hauptsächlich aus Knochen und Leber stammt (Thorén-Tolling 1988a, Islas et al. 1992, Hank et al. 1993). Wie in vorliegenden Untersuchungen macht das Knochen-Isoenzym mit über 70 % an der Gesamtaktivität in diesem Altersabschnitt den Hauptanteil aus. In den ersten 21 Lebenstagen fällt die AP-Aktivität nach Hank et al. (1993) extrem ab. Allein mit einer hohen Osteoblastenaktivität lassen sich diese Veränderungen nicht erklären. Als Ursache für diesen schnellen Aktivitätsabfall wird ein verstärkter Abbau in der Lunge vermutet. Parallel zum Wachstum verringert sich die AP-Aktivität bis zu einem konstanten Niveau ab drittem Lebensjahr (Gygax und

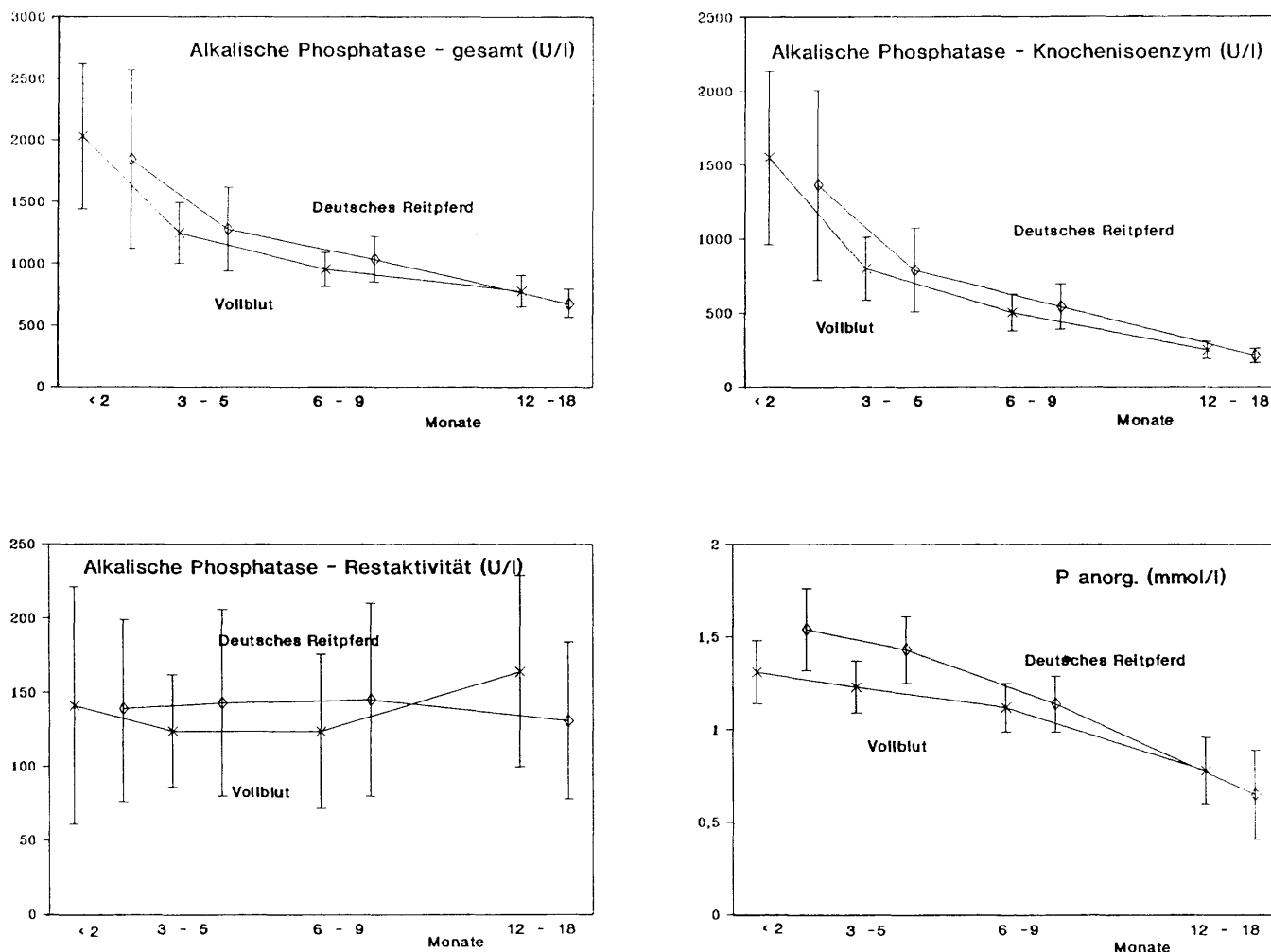


Abb. 2: Verhalten der Alkalischen Phosphatase sowie der Pi-Konzentration im Serum von Pferden der Rasse Englisches Vollblut sowie Deutsches Reitpferd

Course of alkaline phosphatase as well as levels of Pi in serum of horses of breeds Thoroughbred and German Riding Horses

Gerber 1973). Die APL bzw. in vorliegenden Untersuchungen die AP-Restaktivität sind altersunabhängig, so daß die Veränderungen der Gesamt-Aktivität in Übereinstimmung mit Thorén-Tolling (1988b) sowie Hank et al. (1993) allein der APB (Abb. 1 und 2) zuzuordnen sind. Statistisch sind ab zweitem Lebensjahr die APT- sowie APB-Aktivitäten gegenüber den Meßwerten der folgenden Jahre nicht mehr gesichert verschieden. Die analog zur AP ebenfalls stark altersabhängigen Pi-Konzentrationen im Blutserum (Tab. 1 und 2) erreichen bei den Zweijährigen gleichfalls ein stabiles Niveau. Dem entsprechen Literaturangaben von Gyax und Gerber (1973), Unkel (1984) sowie Syrie (1992). Meyer und Lemmer (1973) beschrieben allerdings erst ab achtem Lebensjahr konstante Pi-Konzentrationen. Insgesamt bestätigen aber auch die vorliegenden Erhebungen, daß der Knochenstoffwechsel offensichtlich bei den Zweijährigen keinen wesentlichen Veränderungen mehr unterworfen ist. Die APB-Bestimmung bietet sich somit für die Beurteilung des Knochenreifegrades an.

Zwischen Vollblutzuchtstuten, Reit- sowie Robustpferden fanden Sommer und Syrie (1990) in Übereinstimmung mit

vorliegenden Erhebungen keine Rasseunterschiede der AP-Aktivität. Ein Einfluß des Trainings auf die APT wird von Best (1979) unterschiedlich referiert.

Wie Tabelle 1 zu entnehmen ist, ist bei der Beurteilung von AP-Aktivitäten streng die Altersabhängigkeit zu berücksichtigen. Das betrifft besonders die ersten Lebensmonate, in denen sich die formulierten Altersgruppen signifikant unterscheiden. So müssen diese Ergebnisse von den für Fohlen von Sommer und Syrie (1990) mit < 600 U/l formulierten abgegrenzt werden. Nur geringe Übereinstimmung besteht auch bei gleichartiger Methodik zu den von ihnen beschriebenen Obergrenzen bei Jährlingen (<550 U/l), sowie Reitpferden und Vollblutstuten (120-250 U/l). Die Formulierung unterer Grenzen ist von Bedeutung, da z.B. stärkere azidotische Belastungen sowie Diarrhoen mit einer Abnahme der AP-Aktivität verbunden sind (Fürl und Knyrim 1993).

#### Literatur

Behr, W. and Barnert, J. (1986): Quantification of bone alkaline phosphatase in serum by precipitation with wheat-germ lectin: a simplified method and its clinical plausibility. Clin. Chem. 32 1960-1966.