

**Bestimmung des Verhältnisses der Glukokortikoide Kortisol und Kortikosteron  
im Blut der Katze unter Ruhe- und Stressbedingungen**

Katharina Hannah Pasche  
2009





Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department  
Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. M. H. Erhard

Anfertigung unter der Leitung von  
Prof. Dr. M. H. Erhard

**„Bestimmung des Verhältnisses der Glukokortikoide Kortisol und  
Kortikosteron im Blut der Katze unter Ruhe- und Stressbedingungen“**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Katharina Hannah Pasche  
aus  
Tübingen

München 2009

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun**  
**Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Erhard**  
**Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Kaspers**

**Tag der Promotion: 17. Juli 2009**

**Meiner Mutter und  
meinem Vater  
für ihre Unterstützung**



---

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung .....	13
2.	Literatur .....	14
2.1	Die Katze: Abstammung und Domestikation .....	14
2.2	Die Katze als Haustier in der heutigen Zeit .....	16
2.3	Anatomie und Physiologie der Nebenniere .....	18
2.3.1	Anatomie .....	18
2.3.2	Physiologische Vorgänge während der Stressreaktion .....	21
2.3.3	Physiologie des Nebennierenmarks .....	21
2.3.4	Physiologie der Glukokortikoidregulation .....	22
2.3.5	Biosynthese der Glukokortikoide .....	26
2.3.6	Wirkmechanismus der Glukokortikoide .....	29
2.4	Stress .....	31
2.4.1	Definition und Wirkungsweise .....	31
2.4.2	Kortisol als Stressparameter .....	33
2.4.3	Kortikosteron als Stressparameter .....	37
2.4.4	Ratio von Kortisol und Kortikosteron als Stressparameter .....	38
2.4.5	Nicht-invasive Methoden zur Stressbestimmung.....	40
2.4.6	Die Wirkung von Stress auf den Hämatokrit im Blut.....	41
2.4.7	Der ACTH-Stimulationstest zur Beurteilung der Hypophysen-Hypothalamus- NN Achse bei der Katze .....	43
2.5	Stressfreie Blutentnahme bei Tieren .....	44
2.5.1	Das Venous Access Port System.....	44
2.5.2	Anwendung des VAP bei der Katze .....	45
2.6	Schlussfolgerung für die eigene Zielsetzung .....	47
3.	Tiere, Material und Methoden.....	49
3.1	Förderung und Genehmigung des Forschungsprojekts .....	49
3.2	Tiere .....	49
3.3	Versuchsaufbau .....	51
3.3.1	ACTH-Stimulationstest .....	52
3.3.2	Portimplantation .....	52
3.3.2.1	Portauswahl und Kathetereigenschaften .....	54
3.3.2.2	Operationstechnik.....	54
3.3.3	Adaptation der Tiere an die Versuchsbedingungen.....	56
3.3.4	Stressversuch.....	57
3.3.5	24 h Profil .....	58



3.4	Bestimmung der Konzentrationen von Kortisol und Kortikosteron im Blut der Katzen .....	59
3.4.1	Blutentnahme und Probenaufbereitung .....	59
3.4.2	Bestimmung von Kortisol und Kortikosteron und ihrer Ratio .....	59
3.4.2.1	HPLC-Methodik .....	59
3.4.2.2	Extraktion der Proben .....	60
3.4.2.3	Chromatographische Bedingungen .....	61
3.4.2.4	Berechnung der Glukokortikoidkonzentrationen .....	62
3.5	Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse .....	63
3.5.1	Statistische Analyse der Daten des ACTH-Stimulationstest, des Stressversuchs und des 24 h Profils .....	63
3.5.2	Berechnung der z-scores für die Einzeltierdaten des 24 h Profils .....	64
3.5.3	Untersuchung auf Peaks für die Einzeltierdaten des 24 h Profils .....	65
4.	Ergebnisse .....	66
4.1	ACTH-Stimulationstest .....	66
4.1.1	Kortisolkonzentration im Plasma von Katzen vor und nach ACTH-Applikation .....	67
4.1.2	Kortikosteronkonzentration im Plasma von Katzen vor und nach ACTH-Applikation .....	68
4.1.3	Ratio der Kortisol-/Kortikosteronkonzentration im Plasma von Katzen vor und nach ACTH-Applikation .....	69
4.1.4	Hämatokritwerte von Katzen vor und nach ACTH-Applikation .....	70
4.2	Stresstest .....	71
4.2.1	Kortisolkonzentration im Plasma bei Katern vor und nach Einwirkung eines milden Stressors .....	72
4.2.2	Kortikosteronkonzentration im Plasma bei Katern vor und nach Einwirkung eines milden Stressors .....	73
4.2.3	Ratio der Kortisol-/Kortikosteronkonzentration im Plasma bei Katern vor und nach Einwirkung eines milden Stressors .....	74
4.2.4	Hämatokritwerte bei Katern vor und nach der Einwirkung eines milden Stressors .....	75
4.2.5	Darstellung der Glukokortikoide und ihrer Ratio der einzelnen Kater vor und nach Einwirkung eines milden Stressors .....	76
4.3	24 h Profil .....	84
4.3.1	24 h Profil der Kortisolkonzentration im Plasma weiblicher Katzen .....	84
4.3.2	24 h Profil der Kortikosteronkonzentration im Plasma weiblicher Katzen .....	85
4.3.3	24 h Profil der Ratio der Kortisol-/Kortikosteronkonzentration im Plasma weiblicher Katzen .....	86
4.3.4	24 h Profil der Hämatokritwerte der weiblichen Katzen .....	87

4.3.5	Untersuchung und Darstellung der Einzelwerte der Glukokortikoide und ihrer Ratio jeder Katze.....	88
4.3.6	Untersuchung zur Identifikation eines tageszeitlichen Rhythmus bei der Katze .....	97
4.4	Weiterführende Analysen .....	99
4.4.1	Korrelation zwischen Kortisol, Kortikosteron und ihrer Ratio .....	99
4.4.2	Untersuchung der Streuung in Kortisol, Kortikosteron und ihrer Ratio .....	100
4.4.3	Geschlechterabhängigkeiten.....	101
5.	Diskussion.....	102
5.1	Stresstest .....	106
5.1.1	Glukokortikoidkonzentration vor und nach dem milden Stressor.....	106
5.1.2	Hämatokrit.....	109
5.2	24 h Profil .....	111
5.2.1	Glukokortikoide.....	111
5.2.2	Hämatokrit.....	113
5.2.3	Periodizität .....	114
5.3	Ratio aus Kortisol und Kortikosteron als Stressparameter .....	115
5.3.1	Ratio aus Kortisol und Kortikosteron des Stressversuchs .....	115
5.3.2	Ratio aus Kortisol und Kortikosteron des 24 h Profils.....	116
5.4	Geschlechterabhängigkeiten.....	119
5.5	Methode .....	121
5.5.1	Weitere Auffälligkeiten.....	121
5.5.2	Verhalten der Tiere während der Versuche.....	123
5.6	Schlussfolgerung.....	124
6.	Zusammenfassung.....	126
7.	Summary .....	129
8.	Literaturverzeichnis .....	132
	Danksagung .....	146

## Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
ADH	antidiuretisches Hormon
At I	Angiotensinogen
At II	Angiotensin
AVP	Arginin Vasopressin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CGB	<i>corticosteroid binding globulin</i>
COUP-TF 1	<i>chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor 1</i>
CRH	<i>corticotrophin releasing hormone</i>
CRIF	<i>corticotrophin release inhibitory factor</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Desoxykortikosteron
3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/Isomerase
11 $\beta$ -HSD2	11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 2
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung
GAS	<i>general adaption syndrome</i>
GK	Glukokortikoide
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes-Protein
GRE	<i>glucocorticoid response elements</i>
HPA	<i>hypothalamic pituitary adrenal</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IE	internationale Einheit
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
m	männlich
min	Minute
MK	Mineralokortikoide
MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

nGRE	<i>non glucocorticoid response elements</i>
Nn.	Nervi
NN	Nebenniere
NNM	Nebennierenmark
Nmol	nanomol
NNR	Nebennierenrinde
p	Wahrscheinlichkeitswert, <i>propability value</i>
P450 <sub>aldo</sub>	Aldosteronsynthetase
P450 <sub>C17</sub>	17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-lyase
P450 <sub>C21</sub>	21-Hydroxylase
P450 <sub>11<math>\beta</math></sub>	11 $\beta$ -Hydroxylase
P450 <sub>scc</sub>	<i>side chain cleavage enzyme</i>
PNMT	Phenylätholamin N-Methyl Transferase
POMC	Pro-opiomelanocortin
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
RM	<i>repeated measures</i>
SEM	Standardfehler
S1P	<i>sphingolipide sphingosine-1-phosphate</i>
SNK	Student-Newman-Keuls-Test
StabW	Standardabweichung
StAR	<i>steroidogenic acute regulatory protein</i>
TNF	Tumornekrose Faktor
UCCR	Kortisol-Kreatinin-Ratio im Urin
V.	Vena
VAP	<i>venous access port</i>
w	weiblich



## 1. Einleitung

Die Katze hat sich zu einem Haustier entwickelt, das mittlerweile einen ebenso hohen Stellenwert wie der Hund eingenommen hat. Dies bemerken auch viele Tierärzte in der klinischen Praxis, da die Anzahl der zu behandelnden Katzen zunimmt. Besonders stoffwechselbedingte Erkrankungen treten häufiger auf. Diabetes mellitus und Hyperthyreose, aber auch Erkrankungen der Nebenniere, wie Hyperadrenokortizismus oder Hyperaldosteronismus sind ein immer öfter anzutreffender Vorstellungsgrund. Viele Tiere zeigen in der Praxis transport- und handlingbedingtes Stressverhalten. So fällt eine genaue Evaluierung im Bezug auf die jeweilige Krankheit schwer oder wird sogar falsch interpretiert, da biochemische und hämatologische Parameter (Glukose, Hämatokrit, Leukozyten) im Blut durch Stress erhöht sind. Auch bei bestimmten Krankheiten, wie der idiopathischen Zystitis, ist Stress direkt am Krankheitsgeschehen beteiligt.

Deswegen ist es notwendig, die Stressreaktion bei der Katze genauer bestimmen zu können. Sowohl Katzen in der Tierarztpraxis als auch für Katzenhaltungen in Versuchstieranlagen ist eine Stressbestimmung interessant, da sie hilfreiche Erkenntnisse bezüglich Verhalten und Versuchsabläufen bringen kann. Ein klassischer Stressparameter, Kortisol, kann durch eine spontan gemessene Konzentration nur eine Momentbestimmung sein, da er durch seine episodische Sekretion variiert. Eine Beurteilung eines chronischen Stressgeschehens ist dabei nicht möglich. Bei anderen Spezies konnte festgestellt werden, dass eine Bestimmung der Kortisol- und Kortikosteronkonzentration im Plasma und der Ratio aus beiden Hormonen neue Erkenntnisse über die basale Sekretion der Glukokortikoide und über ihr Verhalten in Stresssituationen brachte (ALBERS et al. 1985, SZETO et al. 2004).

Ziel dieser Arbeit ist es, die Stressreaktion der Katze anhand von Kortisol, Kortikosteron und ihrer Ratio in einem Versuch mit einem milden und kurzzeitigen Stressor (Dusche) zu bestimmen. Zudem soll überprüft werden, wie sich die Hormonsekretion (Kortisol, Kortikosteron und ihre Ratio) über 24 h verhält, um durch einen eventuell vorhandenen tageszeitlichen Rhythmus eine exaktere Bestimmung der Stressreaktion bei der Katze möglich zu machen.

## 2. Literatur

### 2.1 Die Katze: Abstammung und Domestikation

Es ist als gesichert anzusehen, dass die heutige Hauskatze (*Felis silvestris catus*) von der Art „Wildkatze“ (*Felis silvestris*) und ihrer fünf Unterarten „asiatische Steppenkatze“ (*Felis silvestris ornata*), „europäische Waldkatze“ (*Felis silvestris silvestris*), „afrikanische Falbkatze“ (*Felis silvestris libyca*), „südafrikanische Wildkatze“ (*Felis silvestris cafra*) und der „chinesischen Wüstenkatze“ (*Felis silvestris bieti*) abstammt (DRISCOLL et al. 2007). Diese gehören zu der Unterfamilie Kleinkatzen (*Felinae*) in der Familie der Katzen (*Felidae*) der Überfamilie Katzenartige (*Feloidea*) der Ordnung Fleischfresser (*Carnivora*). Dabei wird der afrikanischen Falbkatze die größte Bedeutung als Vorfahre der heutigen Hauskatze zugesprochen (GRZIMEK 1979). Sie ist von zierlicher Statur mit schmalen Kopf und großen Ohren. Ihre Fellfarbe erstreckt sich von sandfarben bis rötlichbraun, gefleckt oder gestreift, aber auch fast ungemustert. Sie hat im Vergleich zu ihrer Verwandten, der europäischen Waldkatze, keinen Aalstrich und eine spitz statt stumpf zulaufende Schwanzspitze. Sie ist ein Einzelgänger und toleriert nur zu Paarungszeit einen Kater in ihrem Revier, auch die Jungen werden nach der Aufzuchtphase aus dem Revier verjagt. Die Tragzeit beträgt 56 bis 60 Tage und ist damit etwas kürzer als bei der europäischen Wildkatze (GRZIMEK 1979). Morphologisch unterscheidet sich die Hauskatze nicht wesentlich von den Wildformen, da es im Laufe der Jahrtausende immer wieder zu Kreuzungen zwischen domestizierten und wilden Katzen gekommen ist (LIPINSKY et al. 2007).

Die Anfänge der Katzendomestikation sind nahezu unbekannt. Erste Knochenfunde von der Falbkatze in Jericho (SERPELL 1988) zwischen 6000 und 7000 v. Chr. lassen vermuten, dass Wildkatzen durch die großen Getreidelager und das damit verbundene Kleinnagerangebot Anschluss an den Menschen gefunden hatten. Somit fand eine erste Domestikation im Nahen Osten, im sog. Fruchtbaren Halbmond, zur Zeit der neolithischen Revolution (5000 – 2000 v. Chr.) statt (DRISCOLL et al. 2007). Die ältesten gesicherten Belege auf eine Domestikation kommen aus Ägypten. Zur Zeit des Alten Reiches (2665 – 2155 v. Chr.) wurden Abbildungen und Darstellungen von Katzen in häuslicher Umgebung

oder mit Halsband gefunden. Diese gelten als sicherer Beweis für eine Gefangenschaft oder Domestikation von Wildkatzen. Zur Blütezeit des Bastetkultes (945 - 715 v. Chr.) wurde die Katze als heiliges Tier der Fruchtbarkeitsgöttin Bastet verehrt. Es kam zu Massenhaltungen von Katzen, insbesondere im heiligen Tempel von Bubastis, der Landeshauptstadt Ägyptens zu dieser Zeit (SERPELL 1988). Aus dieser Zeit stammt auch der Brauch der Katzenmumifizierung. Über Handelsbeziehungen Ägyptens zu Palästina und Griechenland kam es zu einer schrittweisen Verbreitung von Katzen. Erste Darstellungen in Europa gab es ca. 480 v. Chr. in Griechenland und Süditalien (BENECKE 1994).

In römischen Schriften finden sich wenige Angaben zu Katzen. Sie waren dort eher eine Kuriosität, denn zur Nagetierbekämpfung wurden Iltisse oder Frettchen bevorzugt (SERPELL 1988). Im 4. Jahrhundert n. Chr. wurden nun auch Katzen zur Schädlingsbekämpfung eingesetzt, nachdem Palladius seine Empfehlung für die Katze zur Eindämmung der Maulwürfe auf Artischockenfeldern niederschrieb (SERPELL 1988). Durch die Expansion des Römischen Imperiums gelangte die Katze auch in Gebiete nördlich der Alpen. Da die heutige Hauskatze massiger und kurzbeiniger ist als ihre nordafrikanischen Verwandten, ist anzunehmen, dass sie sich im Verlauf ihrer Ausbreitung über Europa und Asien sowohl mit der europäischen Wildkatze als auch mit der asiatischen Steppenkatze wiederholt kreuzte (GRZIMEK 1979, BENECKE 1994). Durch verschiedene Knochenfunde belegt, wird die Katze seit der Mitte des 1. Jahrhunderts n. Chr. als fester Bestandteil eines Haushaltes gezählt. Im Vergleich zu den heutigen Hauskatzen waren diese Exemplare deutlich zierlicher und kurzbeiniger. Im Mittelalter kam den Katzen eine undankbare Rolle zu. Sie waren durch Aberglaube und die Inquisition als Abkömmlinge des Teufels geahndet, wurden gejagt und vielerorts zusammen mit Hexen verbrannt (SERPELL 1988).

Erst seit dem 18. und 19. Jahrhundert wurden Katzen gezüchtet. Ihren Ursprung nahm die Katzenzucht in England, wo zu dieser Zeit verschiedene Katzen aus den ausländischen Kolonien ankamen und die Grundlage der Katzenzucht bildeten. Zu den ersten Rassekatzen zählen die Karthäuserkatze, die Angorakatze, die



Perserkatze und die siamesische Katze. Im Jahre 1871 fand die erste Katzensausstellung der Welt in London statt (BENECKE 1994).

## **2.2 Die Katze als Haustier in der heutigen Zeit**

Der Mensch hat zur heutigen Hauskatze in ihrer ganzen Rassenvielfalt nach dem Hund die engste emotionale Beziehung entwickelt (BENECKE 1994). Trotzdem steht die Katze in vielerlei Hinsicht noch hinter dem Hund zurück (SERPELL 1988). Auch die Annahme vieler praktizierender Tierärzte, „die Katze sei ein kleiner Hund“ ist vereinzelt noch verbreitet, obwohl schon seit langem das Gegenteil erwiesen ist. Aufgrund der wachsenden Population, mehr als 7,8 Millionen allein in Deutschland (SANDS 2007), gewinnt die Katze in der Kleintierpraxis immer mehr Bedeutung. Bei komplex auftretenden Erkrankungen, wie zum Beispiel Malfunktionen des endokrinen Systems, kann die Bestimmung des Stressniveaus eine essentielle Entscheidungshilfe sein. So kann bei veränderten klinischen Parametern, wie zum Beispiel erhöhte Blutglukose oder erhöhte Leukozytenzahlen, durch Kenntnis des Stressniveaus eine exaktere Therapie ausgewählt werden, und damit dem Tier besser geholfen werden. Auch Hinweise auf eine geringere Toleranz gegenüber Stress bei Erkrankungen, wie der feline idiopathischen Zystitis (WESTROPP et al. 2006), zeigen auf, wie wichtig es im klinischen Alltag ist, Stressparameter einer kranken Katze genau zu evaluieren (GUNN-MORE und CAMERON 2004).

Neben den klinisch manifesten Erkrankungen sehen sich praktizierende Tierärzte immer öfter mit Verhaltensproblemen konfrontiert. Durch das enge Zusammenleben zwischen Katze und Mensch, aber auch in Gruppenhaltung bei Katzen untereinander, kommt es für die fakultativ soziale Katze öfter zu Stressreaktionen, die in verschiedenen Verhaltensänderungen resultieren. Die Tiere zeigen meist Unruhe und Angst. Sie ändern ihr Verhalten dahingehend, dass sie unsauber werden und ihre Umgebung markieren (HUNTHAUSEN 1999, LEVINE 2008). Deswegen ist es entscheidend für die Verhaltenstherapie der Katze, Stressreaktionen richtig zu beurteilen, um somit eine genaue Diagnose und eine passende Therapie erstellen zu können. Auch die medikamentelle Therapie spielt hier eine Rolle. Zum einen besteht sie aus Psychopharmaka, die auch in der

Humanmedizin zur Verwendung kommen (trizyklischen Antidepressiva und Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmern), zum anderen aus den sog. Pheromonanaloga (LEVINE 2008). Die natürlichen Pheromone werden von der Katze über das Reiben des Kopfes oder Körpers an Flächen (F3-Pheromon) oder zwischen Artgenossen (Allomarkieren, F4-Pheromon) an die Außenwelt abgegeben und von anderen Katzen wahrgenommen. Sie kommen in Form von Spray und Zerstäuber in der Umgebung der Tiere zum Einsatz und haben bei verschiedenen Studien das Wohlbefinden und das positive Verhalten von Katzen wesentlich verbessert (HUNTHAUSEN 1999, GRIFFITH et al. 2000, LEVINE 2008).

## 2.3 Anatomie und Physiologie der Nebenniere

### 2.3.1 Anatomie

Die Nebenniere (NN), Glandula suprarenalis oder Glandula adrenalis, liegt als paariges Organ bei der Katze retroperitoneal medial des cranialen Nierenpols, von einer bindegewebigen Kapsel umgeben, im perirenal Fett und Bindegewebe eingebettet. Dabei hat die linke NN eine enge Lagebeziehung zur Aorta abdominalis, während die rechte NN bindegewebig mit der Vena cava caudalis verbunden ist. Ihre Form ist bei der Katze von ovaler Gestalt, ihre Farbe gelblich-weiß, zudem sind beiden NN bei der Katze gleich groß (NICKEL et al. 1992, FREWEIN 1994). SCHWARZE (1941) vermaß die NN von Hund und Katze und kam bei der Katze zu folgenden Werten: Länge 0,8 - 1,5 cm, Breite 0,5 - 1,0 cm, Dicke 0,2 - 0,4 cm und ein Gewicht von 40 bis 400 mg. Größe und Gewicht können aufgrund von Geschlecht und hormonellem Geschehen variieren (SCHWARZE 1941). Zimmer et al. (2000) ermittelten folgende Werte: eine Länge von 0,45 bis 1,37 cm und eine Breite von 0,29 bis 0,53 cm. Sie konnten einen geschlechtspezifischen Unterschied nicht bestätigen (ZIMMER et al. 2000).

An der Schnittfläche erkennt man makroskopisch die Aufteilung in die hellere, radiär gezeichnete Rinde und das etwas dunklere rotbräunliche Mark. Dies gibt den ersten Hinweis darauf, dass die NN ein zusammengesetztes Organ ist: die Nebennierenrinde (NNR) entsteht aus dem mesodermalen Zölomepithel, während das Nebennierenmark (NNM) sich aus dem Neuroektoderm entwickelt und somit ein sympathisches Paraganglion suprarenale ist (THUN und SCHWARTZ-PORSCHKE 1994, SINOWATZ 2008). Die NNR wiederum lässt sich in drei Zonen unterteilen: die subkapsuläre Zona arcuata seu glomerulosa, zur Produktion von Mineralokortikoiden, eine mittlere Zone fasciculata, Ort der Synthese der Glukokortikoide (GK) und eine innere Zone reticularis, Syntheseort der 17-Ketosteroiden. Die adrenocorticalen Zellen sind reich an Mitochondrien mit tubulovesikulären Christen, zahlreiche Fetttröpfchen und dem glatten endoplasmatischen Retikulum, die beide für die Steroidhormonsynthese essentiell sind (EHRHART-BORNSTEIN et al. 1998, BÖCK UND LIEBICH 1999). Auch im Fetus ist eine Aufteilung in drei Zonen erkennbar, die sich mit den drei Zonen der NNR von ausgewachsenen Tieren decken (COULTER und JAFFE 1998). Im NNM

werden Adrenalin und Noradrenalin in den sog. chromaffinen Zellen produziert. Diese sind nach ihrer Fähigkeit benannt, sich unter Zugabe von Chromsalzen braun anzufärben. Sie unterteilen sich in zwei Typen, die Noradrenalin-Zellen und die Adrenalin-Zellen. Die ersten enthalten sehr elektronendichte Granula mit Noradrenalin, während der zweite Typ wenig elektronendicht ist und Adrenalin enthält. Bei der Katze sind sehr viele Noradrenalin-Zellen nachgewiesen worden, während Pflanzenfresser und Schwein überwiegend mit Adrenalin-Zellen versorgt sind (BÖCK und LIEBICH 1999). Durch neuere Erkenntnisse kann der Standpunkt von zwei komplett voneinander getrennten Organanteilen in der NN nicht mehr gehalten werden. So wurden in allen Zonen der NNR Chromaffinzellen, die als Inseln im Gewebe verteilt oder radiär angeordnet sind, nachgewiesen. Umgekehrt wurden kleine Inseln von NNR-Zellen im NNM gefunden oder sie befanden sich noch in direkten Kontakt mit der Rinde (ERHART-BORNSTEIN et al. 1998, SCHINNER und BORNSTEIN 2005).

Die Blutversorgung ist für die Funktion der NN als Hormonsyntheseort von entscheidender Bedeutung. Sie kommt zum einen direkt aus der Aorta abdominalis als Arteriae suprarenales, ihre Anzahl kann individuell sehr variieren. Zum anderen erhält die NN Blut aus der A. phrenicolumbalis und der A. renalis, die sich weiter in kleine Rami suprarenales aufzweigen. Nach dem Durchtritt durch die Kapsel bilden sich die Gefäße zu sinusoiden Kapillaren aus, die sich netzartig entlang der Radiärstruktur der Rinde verteilen. Ein Teil führt als kleine Arterien (Arteriae perforantes seu perpendiculares) in das Mark, um es mit sauerstoffreichem Blut versorgen. Gleichzeitig dienen sie auch zum Transport von GK, um im Mark die Synthese von Noradrenalin zu Adrenalin enzymatisch einzuleiten (EHRHART-BORNSTEIN et al. 1998, KÖNIG und LIEBICH 1999). Ein Teil von ihnen mündet in ein Netz von weitleumigen Kapillaren, die in einer großen Zentralvene (V. centralis) zusammenlaufen. Sie durchzieht das Mark in seiner ganzen Länge. Über eine bis vier Venae suprarenales wird der Blutabfluss durch die den NN aufliegenden V. lumbales in die Vena cava caudalis geleitet (NICKEL et al. 1992, FREWEIN 1994, IKI 2005).

Die Lymphgefäße bilden im Parenchym und unter der Kapsel Kapillarnetze aus und leiten die Lymphe in die Lymphonodi lumbales aortici (KÖNIG und LIEBICH 1999).

Die NN ist ein Organ mit reicher Innervation. Diese erfolgt hauptsächlich über die sympathischen und mitunter auch über die parasymphathischen Anteile des vegetativen Nervensystems. Die präganglionäre, parasymphathische Innervation entstammt Anteilen des N. Vagus (NICKEL et al. 1992). Die sympathischen Nervenfasern laufen aus dem Rückenmark in die paravertebralen Ganglien des Grenzstrangs und werden in den prävertebralen Ganglien zu postganglionären, adrenergen Neuronen umgeschaltet. Diese prävertebralen Ganglien, die Nervenfasern an die NN abgeben, umfassen folgende: das Ganglion coeliacum, das Ganglion mesentericum craniale, den Plexus renalis und den Plexus suprarenalis. Die NN der Katze zeigt eine duale sympathische Innervation mit präganglionären, cholinergen, als auch postganglionären, adrenergen Neuronen (PRENTICE und WOOD 1975). Ein Teil der sympathischen Nervenfasern aus dem Rückenmark gelangt als Nn. Splanchnici ohne Umschaltung (präganglionär, cholinerg) in die Kapsel, wo sie sich zu einem dichten Geflecht zusammenfügen. Von diesem ausgehend dringen sie entlang dünner Bindegewebssepten in die Rinde vor. An der Rinden-Mark-Grenze und im NNM bilden sie weitmaschige Nervenfasernetze. So durchziehen sie zunächst die NNR um sich dann mit den chromaffinen Zellen des Marks eine synaptische Endigung zu bilden.

Postganglionäre, adrenerge Nervenfasern innervieren hauptsächlich die NNR mit ihren Zellen und Gefäßen, während die präganglionären, cholinergen Nervenendigungen sowohl in der Rinde als auch im Mark verteilt vorkommen (NICKEL et al. 1992, BÖCK und LIEBICH 1999). Neben dieser exogenen Innervation ist auch eine endogene Innervation der NN beschrieben. Dabei dienen Zellen des NNM als postganglionäre Neurone, die sowohl die chromaffinen Zellen des NNM als auch NNR-Zellen innervieren (EHRHART-BORNSTEIN et al. 1998, IKI 2005).

### 2.3.2 Physiologische Vorgänge während der Stressreaktion

Nach der Wahrnehmung eines Stressors kommt es zu einer Reaktion des Körpers, die von zwei Hauptregulationsmechanismen des neuroendokrinen Systems bestimmt ist: das autonome Nervensystem und die Hypothalamus-Hypophysen-NN Achse (engl. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*, HPA-Achse).

Kognitive Reize erreichen die Großhirnrinde und führen über neuronale Impulse zu einer hypothalamischen Stimulation des autonomen Nervensystems. Somit kommt es zu einer Aktivierung des Sympathikus. Die Wirkung ist gekennzeichnet durch die Freisetzung von Noradrenalin aus sympathischen Nervenendigungen, zum anderen wird im Nebennierenmark Adrenalin und kleine Mengen Noradrenalin freigesetzt. Dies führt zu einer Erhöhung der kardiovaskulären Funktion, um das physische Potenzial des Individuums zu erhöhen. Dieser Prozess wird auch unter dem Begriff „*fight or flight*“-Reaktion verstanden (FRANK und GRIFFIN 1989).

Wenn die sog. „*fight or flight*“-Reaktion es nicht schafft, den Körper wieder ins Gleichgewicht zu bringen, und der Stress weiter bestehen bleibt, kommt es zur Aktivierung der HPA-Achse. Das *corticotropin releasing hormone* (CRH) im Hypothalamus führt zu einer Ausschüttung von adrenokortikotropen Hormon (ACTH) in der Hypophyse. Über die Blutbahn gelangt ACTH zur NNR, wo es zur Stimulation der GK-Produktion kommt. Diese rufen im Körper verschiedene metabolische Prozesse hervor. Sie steigern in der Leber die Glukoneogenese, so dass der Körper mehr Energie in Form von Zucker zur Verfügung hat. Weitere Prozesse führen zu einer entzündungshemmenden und immunsuppressiven Wirkung (DOHMS und METZ 1991).

### 2.3.3 Physiologie des Nebennierenmarks

Die chromaffinen Zellen des NNM sind Ort der Synthese, Speicherung und Freisetzung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin. In Ruhe ist die Sekretion der Katecholamine sehr gering. Unter emotionalen Erregungszuständen oder erhöhter physischer Belastung kommt es dagegen zu einer Aktivierung des Sympathikustonus. Dies führt an den präganglionären Nervenendigungen zu einer

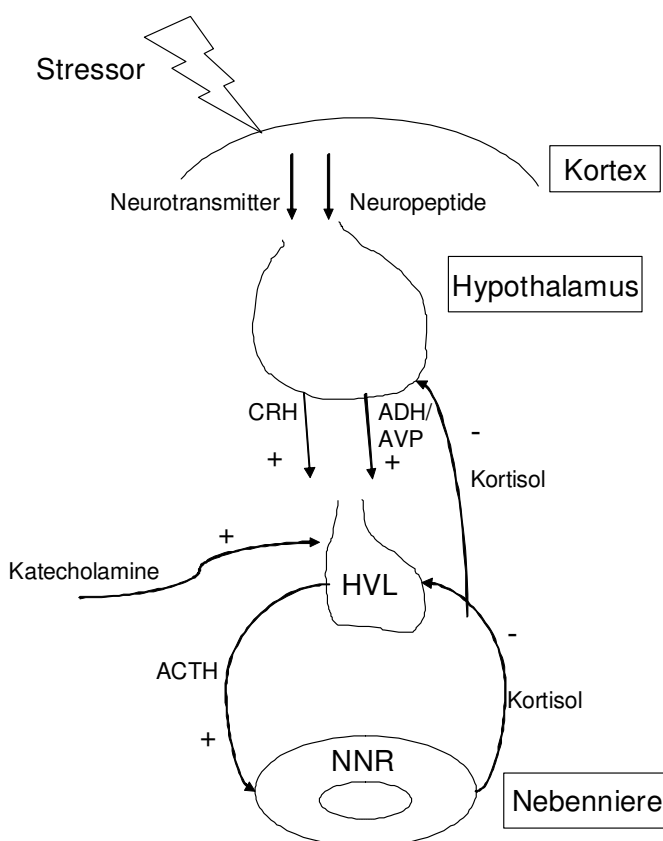
Ausschüttung von Azetylcholin. Die darauf folgende Zunahme des intrazellulären Kalziums veranlasst die Exozytose der Adrenalin- und Noradrenalin-speichernden Vesikel. Diese Synthese von Adrenalin wird durch GK verstärkt, welche über die Blutgefäße ins Mark gelangen (ZUCKERMAN-LEVIN et al. 2001, SCHINNER und BORNSTEIN 2005). Umgekehrt führt die Freisetzung von Adrenalin und Noradrenalin zu einer vermehrten Bildung von GK. Ihre verschiedenen Wirkungen (metabolische und kardiovaskuläre Wirkungen) und Aufgaben werden durch vier Subtypen adrenerger Rezeptoren vermittelt ( $\alpha$ 1-/ $\alpha$ 2- und  $\beta$ 1-/ $\beta$ 2- Rezeptoren). Adrenomedulläre Katecholamine sind wichtige Regulatoren für die Stressantwort eines Organismus, bei der Immunantwort und des Blutdruckes. Auch bei der Energiehomöostase spielen sie eine entscheidende Rolle. Hier führen sie zu einer Mobilisation von gespeicherten Fett- und Glukosereserven, so dass diese wieder zur Energieproduktion vorhanden sind (DÖCKE 1994, SHINNER und BORNSTEIN 2005).

### **2.3.4 Physiologie der Glukokortikoidregulation**

Die Synthese und Ausschüttung der NNR-Hormone wird über Interaktionen und Rückkopplungsmechanismen zwischen dem Hypothalamus, der Adenohypophyse und den NN reguliert. Darüber hinaus sind weitere neuronale und direkte, von der HPA-Achse unabhängige Stimuli beschrieben worden (EHRHART-BORNSTEIN et al. 1998, IKI 2005).

Bei einer Stressreaktion werden über Neuropeptide und Neurotransmitter (Acetylcholin und 5-Hydroxytryptamin) Signale von der Kortex zum Nukleus paraventricularis des Hypothalamus gesendet, wo es zu einer Synthese von *corticotropin releasing hormone* (CRH) und Arginin Vasopressin (AVP) kommt (Abb. 1). Wegen seiner Funktion bei der Wasserretention in der Niere ist AVP auch unter dem Begriff antidiuretisches Hormon (ADH) bekannt. Beide Hormone werden über Axone zur medianen Eminenz des Hypophysenstiels geleitet, wo sie in das adenohypophysäre Pfortadersystem ausgeschüttet werden. Durch Bindung von CRH an Typ 1 CRH-Rezeptoren an der Zelloberfläche von adenohypophysären Zellen wird im Hypophysenvorderlappen die Neubildung und Sekretion von ACTH erwirkt (Abb. 1). AVP wirkt hauptsächlich bei Rind und Schaf

synergistisch zusammen mit CRH auf die ACTH-Freisetzung, während bei Mensch und Ratte AVP eine schwächere Wirkung auf ACTH hat. Beide, AVP und CRH, werden pulsatil ausgeschüttet, wobei eine individuelle Variation des Sekretionsmusters festgestellt wurde (ENGLER et al. 1999). ACTH spaltet sich enzymatisch aus einem Präkursormolekül, dem Pro-opiomelanocortin (POMC) ab, welches auch Sequenzen für  $\gamma$ -Lipoprotein,  $\beta$ -Endorphin sowie  $\alpha$ -Melanotropin,  $\beta$ -Melanotropin und *corticotropin-like intermediate lobe peptide* enthält. Nachdem ACTH ins Kreislaufsystem abgegeben wurde, bindet es an die Zellen der NNR (Abb. 1). ACTH veranlasst über verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden die Bildung von GK, androgenen Steroiden und in einem geringen Ausmaß auch von MK (CHARMANDARI et al. 2005, LIGHTMAN 2008).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse.** CRH: *corticotrophin releasing hormone*, ADH/AVP: Antidiuretisches Hormon/Arginin Vasopressin, HVL: Hypophysenvorderlappen, ACTH: adrenokortikotropes Hormon. NNR: Nebennierenrinde.



In der Hypophyse, im Hypothalamus, sowie im Hippokampus binden GK zuerst an MK-Rezeptoren, während sie erst bei erhöhten Konzentrationen auch an GK-Rezeptoren binden. Dies bewirkt in der Hypophyse eine Inhibition der ACTH-Sekretion und der POMC-Gen-Transkription, während der negative Rückkopplungsmechanismus im Nukleus paraventricularis eine Abnahme der CRH- und AVP-Ausschüttung bewirkt (siehe Abb. 1). Diese Rückkopplung lässt sich in zwei Phasen unterteilen: ein schnelles Feedback, welches, nach wenigen Minuten die ACTH-Sekretion hemmt, und eine verzögerte Phase, die über Stunden bis Tage die basale wie auch die stimulierte ACTH-Ausschüttung unterdrückt (THUN und SCHWARTZ-PORSCHKE 1994, ORTH und KOVACS 1998, IKI 2005). ENGLER et al. (1999) vertreten gleichzeitig die Theorie, dass es neben dem oben beschriebenen Rückkopplungsmechanismus auch einen inhibitorischen Faktor, den sog. *corticotropin-release-inhibitory factor* (CRIF) mit Wirkung auf CRH gibt. Auch Kortikosteron kann im Gehirn einen negativen Rückkopplungsmechanismus bewirken. Über seine Wirkung an den GK-Rezeptoren blockiert es die stress-induzierte Aktivierung der HPA-Achse an hypothalamischen CRH-Neuronen (DE KLOET et al. 1998). Kortikosteron reguliert über den MK-Rezeptoren die Aufrechterhaltung der basalen Funktion der HPA-Achse und ist für die Sensitivität gegenüber einem Schwellenwert bei Stresseinwirkung relevant (DE KLOET et al. 1998, RAUBENHEIMER et al. 2006).

Des Weiteren stimuliert ACTH die Ausbildung von *gap junctions* zwischen den NNM-Zellen und den Zellen der NNR, was ausschlaggebend für die Hormonantwort ist. So kann es durch die *gap junctions* zu einer Signalweiterleitung von stimulierten Zellen zu unstimulierten Zellen kommen. Diese *gap junctions* kommen hauptsächlich in der Zona fasciculata und reticularis vor, während sie in der Zona glomerulosa weniger angetroffen werden (MURRAY et al. 2003).

Auch das Immunsystem hat regulierende Wirkungen auf die Synthese von Steroidhormonen. So greifen Zytokine, wie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrose Faktor (TNF), bei einer Stimulation des Immunsystems, z. Bsp. bei einem inflammatorischen Geschehen, in die HPA-Achse ein. Dabei erhöht die Anwesenheit von IL-6 die Ausschüttung von Kortikosteron bei NN-Zellen von

Ratten. Unter der Einwirkung eines chronischen Stressors kommt es dauerhaft zu erhöhten GK-Konzentrationen im Plasma, gleichzeitig ist die ACTH-Konzentration gering. So kann IL-6 bei langzeitigen chronischen Stressoren, wie z.Bsp. bei Knochenbrüchen oder Verbrennungen, zu einer ACTH-unabhängigen Ausschüttung von GK führen (SALAS et al. 1989, IKI 2005).

Die Nn. splanchnici haben neben ihrer innervierenden Funktion, auch Effekte auf die Regulation der GK-Ausschüttung. Bei ihrer Stimulation kommt es zu einer vermehrten ACTH-Produktion, und somit erhöht sich die Kortisol- und Aldosteron-Sekretion. Diese Effekte der stimulierten Nn. Splanchnici werden durch eine lokale Ausschüttung von Neurotransmittern entweder aus den Nervenendigungen selbst oder aus NNM-Zellen, vermittelt (ERHART-BORNSTEIN et al. 1998).

Neben der hormonalen Steuerung der NNR über die HPA-Achse existieren noch weitere, ACTH-unabhängige Regulationsmechanismen. Die enge Lageverbindung von NNM und NNR lässt eine parakrine Regulation der Steroidogenese zu. So kommt es an der kortiko-medullaren Grenze zu einer parakrinen Regulation der Steroidhormonsynthese über die Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin. Neben den Katecholaminen produzieren die chromaffinen Zellen des NNM auch eine ganze Reihe von Neuropeptiden, die auch an der Synthese der kortikalen Hormone beteiligt sind. Diese sind: CRH, Enkephaline, Neuropeptid Y, Substanz P, AVP, vasoaktives intestinales Peptid, Somatostatin und *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*. Diese Neuropeptide haben sowohl stimulierende, wie auch inhibitorische Wirkungen auf die GK-Synthese. Es wurden selektive Einflüsse auf die Ausschüttung einzelner Steroidhormone nachgewiesen, allerdings war dies auf einzelne Tierarten (z. Bsp. Frosch) und Versuchsmodelle (perifusierte Explanate von NN) beschränkt (ERHART-BORNSTEIN et al. 1998, SCHINNER UND BORNSTEIN 2005).

Die Bildung von GK ist bei den verschiedenen Tierarten unterschiedlich. Bei Mensch, Schwein, Pferd, Hund, Katze und Hase wird hauptsächlich Kortisol gebildet, während bei Ratte, Maus, Hamster, Kaninchen Kortikosteron das vorherrschende GK ist (FELDMAN 1983, IRVINE und ALEXANDER 1994,

SCHWARTZ-PORSCHKE 1994, ISCHIMURA und HUIJITA 1997, BOONSTRA und TINNIKOV 1998, SZETO et al. 2004).

### 2.3.5 Biosynthese der Glukokortikoide

Nachdem ACTH aus der Hypophyse ins periphere Blut abgegeben wurde, bindet es an den Melanocortin-2-Rezeptor der Zona fasciculata-Zellen der NNR. Dies führt zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase, einem erhöhten intrazellulären Spiegel an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), und einer Aktivierung einer cAMP-abhängigen Proteinkinase. Diese Proteinkinase leitet über Zwischenschritte die Transkription von *steroidogenic acute regulatory* (StAR) Protein ein (SEWER et al. 2007).

Alle NNR-Steroide werden aus Cholesterol gebildet, welches beim Menschen hauptsächlich an *low density lipoprotein* gebunden aus dem Blut stammt oder zu 20% in der NN de novo aus Acetyl-CoA synthetisiert wird (ORTH und KOVACS 1998). Über zwei Rezeptoren, den *scavenger receptor* Klasse B Typ 1 (v. a. Ratte) und den *low density lipoprotein receptor* (v. a. Mensch), gelangt Cholesterol in die Zellen der Zona fasciculata. Dort spaltet die hormonsensitive Lipase die Esterbrücken und bildet somit freies Cholesterol. Anschließend wird das freie Cholesterol vom StAR Protein, mittels eines Cholesterol-bindenden hydrophoben Tunnels von der äußeren Mitochondrienmembran zu inneren Membran gebracht. Dies ist der limitierende Schritt in der Steroidhormonbiosynthese (STOCCO 2001, SEWER et al. 2007).

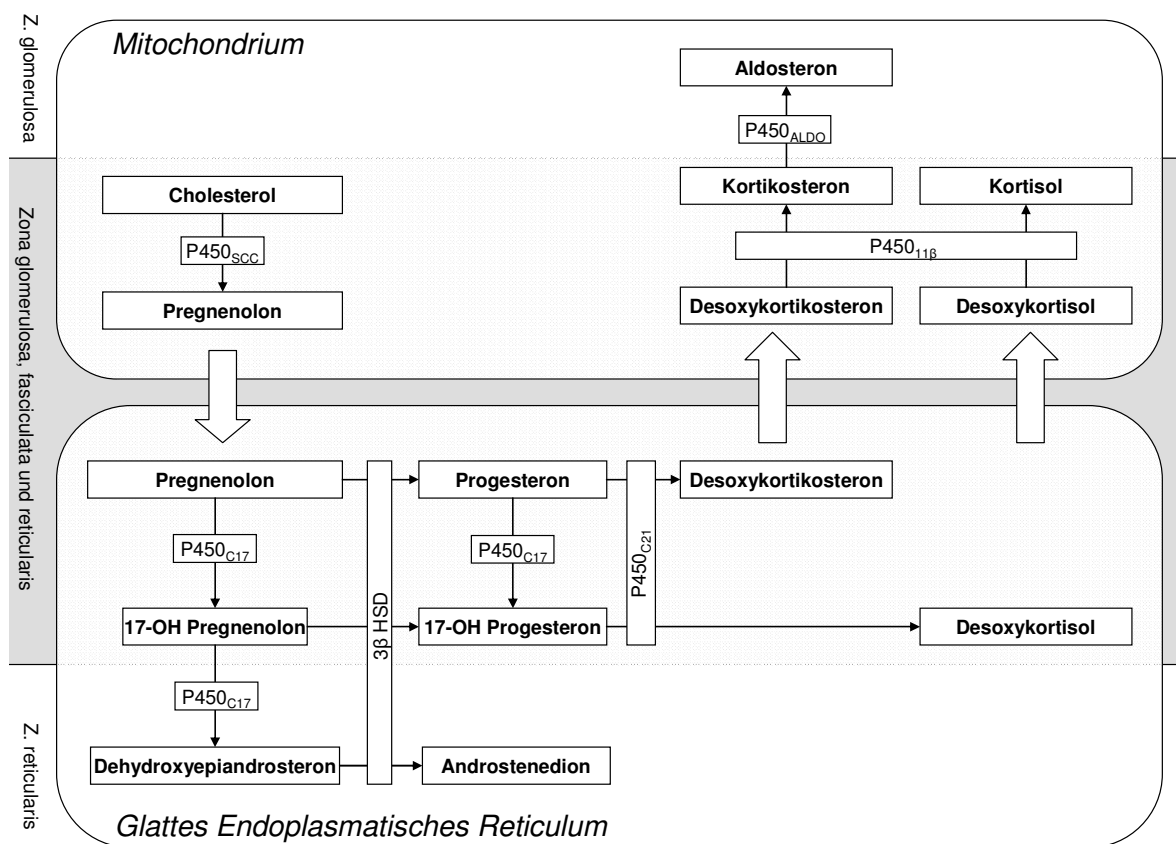
Alle Enzyme der Steroidbiosynthese gehören der Zytochrom P450 Superfamilie (CYP) an. Das erste Enzym ist das *side chain cleavage enzyme*, P450<sub>scc</sub> (CYP11A1), welches an der Innenseite der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert ist. Dieses Enzym katalysiert die Seitenkettenabspaltung von Cholesterol zu Pregnenolon (siehe Abb. 2). Dies passiert durch eine Hydroxilierung am Kohlenstoffatom C 22, dann am Kohlenstoffatom C 20 und durch eine Trennung der C-20,-22 Brücke. Dafür werden in der mitochondrialen Matrix reduzierte Elemente von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) durch eine Adrenodoxin Reduktase (ein Flavoprotein) zu Adrenodoxin (einem

Eisenschwefelprotein) übertragen. Adrenodoxin wiederum transferiert dann Elektronen zu P450<sub>scc</sub> (CYP11A1). Das Enzym kommt in allen drei Zonen der NNR vor (SIMPSON und WATERMAN 1988, HANUKOGLU 1992). Für den nächsten Syntheseschritt wird Pregnenolon aus dem Mitochondrium ins glatte endoplasmatische Retikulum transferiert. Dort wird es auf zwei verschiedene Wege konvertiert.

Einmal wird es durch die Zytochrom P450 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase (P450<sub>C17</sub>, CYP17) in 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon katalysiert (siehe Abb. 2). Dieses mikrosomale Enzym (P450<sub>C17</sub>) katalysiert bei Mensch, Rind, Schaf und Schwein zwei Reaktionen: es kann sowohl die Hydroxilierung des C<sub>17</sub>-Atoms und die Seitenkettenabspaltung an der C<sub>17</sub>-C<sub>21</sub> Verbindung von Pregnenolon als auch Progesteron katalysieren. Welche der beiden Reaktionen stattfindet, hängt von der Elektronenzufuhr ab, die das Enzym von einem Flavoprotein (NADPH-P450 Reduktase) bekommt. Die NADPH-P450 Reduktase transferiert 2 Elektronen von NADPH zu der P450<sub>C17</sub>. Mit einem ausreichenden Elektronenfluss können beide Prozesse vorkommen. Da dieses Enzym in der Zona glomerulosa nicht vorkommt, wird Pregnenolon dort in MK konvertiert (siehe Abb. 2; SIMPSON und WATERMAN 1988, ISCHIMURA und FUJITA 1997).

Die P450<sub>C17</sub> spielt eine entscheidende Rolle ob Kortisol oder Kortikosteron gebildet wird. Durch die ACTH-Ausschüttung wird die Produktion von *sphingolipide sphingosine-1-phosphate* (S1P) in der NNR-Zelle stimuliert und S1P wird in den extrazellulären Raum abgegeben. Dort bindet es an einen Guaninnucleotid-bindendes(G)-Protein gekoppelten Rezeptor und veranlasst so die Transkription von P450<sub>C17</sub> und der Kortisolsynthese. Durch einen Rezeptor am Zellkern, den *chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor 1* (COUP-TF 1) wird beim Menschen die Transkription von P450<sub>C17</sub> stimuliert, während COUP-TF 1 beim Rind diese Transkription unterdrückt. Dies ist ein Hinweis, dass Spezies-spezifische Mechanismen der co-regulatorischen Proteine vorgeben, ob COUP-TF 1 die Synthese von P450<sub>C17</sub> aktiviert oder unterdrückt (SEWER et al. 2007).

Der nächste Umwandlungsschritt, von Pregnenolon zu Progesteron, erfolgt durch die  $3\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/Isomerase  $3\beta$ -HSD (siehe Abb. 2). Dabei wird die 3-Hydroxylgruppe dehydrogeniert und es erfolgt eine Isomerisation an der  $C_5$ -Doppelbindung. Ebenso kann durch die  $3\beta$ -HSD die Umwandlung von  $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon zu  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron erfolgen (ORTH und KOVACS 1998).  $3\beta$ -HSD kommt bei Mensch, Affe, Rind, Schaf, Meerschwein und Ratte in allen drei Zonen der NN vor (SIMPSON und WATERMAN 1988, ISCHIMURA und FUJITA 1997).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Steroidhormonbiosynthese in den drei Zonen der Nebennierenrinde.** P450<sub>SCC</sub>: side chain cleavage enzyme (CYP11A1), P450<sub>C17</sub>:  $17\alpha$ -Hydroxylase/ $17,20$ -Lyase (CYP17),  $3\beta$ -HSD:  $3\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/Isomerase, P450<sub>C21</sub>:  $21$ -Hydroxylase (CYP21A2), P450<sub>11β</sub>:  $11\beta$ -Hydroxylase (CYP11β1), P450<sub>aldo</sub>: Aldosteronsynthetase (CYP11β2).

Progesteron sowie  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron werden durch ein drittes Cytochrom P450 Enzym hydroxiliert: die  $21$ -Hydroxylase (P450<sub>C21</sub>, CYP21A2). Es entsteht Desoxykorticosteron (DOC) und  $11$ -Desoxykortisol (siehe Abb. 2). Auch dieses Enzym wird, wie schon die P450<sub>C17</sub>, durch die NADPH Reduktase mit Elektronen

versorgt. Beide Substrate, DOC und 11-Desoxykortisol, verlassen dann das glatte endoplasmatische Retikulum, um für den letzten Schritt der Biosynthese wieder ins Mitochondrium zu gelangen. Hier werden sie durch ein zweites mitochondriales Cytochrom P450 Enzym konvertiert.

Die 11 $\beta$ -Hydroxylase (P450<sub>11 $\beta$</sub> , CYP11 $\beta$ 1) katalysiert DOC zu Kortikosteron und 11-Desoxykortisol zu Kortisol (siehe Abb. 2). Es ist wie P450<sub>scc</sub> in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert und kommt in allen drei Zonen der Nebennierenrinde vor. Dabei verwendet P450<sub>11 $\beta$</sub>  bei Mensch und Ratte ebenso wie P450<sub>scc</sub> reduzierte Elemente, die von Adrenodoxin Reduktase und Adrenodoxin zur Verfügung gestellt wurden (ORTH und KOVACS 1998).

Kortikosteron ist das Haupt-GK bei Ratte, Maus, Hamster und Kaninchen. Bei der Ratte ist dies auf das nicht Vorhandensein der 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-lyase (P450<sub>C17</sub>, CYP17) in der Zona fasciculata zurückzuführen. Bei dieser Tierart wird Pregnenolon direkt zu Progesteron durch die 3 $\beta$ -HSD umgewandelt. Progesteron wird dann über DOC zu Kortikosteron synthetisiert. Während beim Menschen und höher entwickelten Säugetieren Kortisol das Haupt-GK ist (siehe Abb. 2; WATERMAN und SIMPSON 1988, HANUKOGLU 1992, CONLEY und BIRD 1997, ISCHIMURA und FUJITA 1997).

### 2.3.6 Wirkmechanismus der Glukokortikoide

Nachdem Kortisol aus den Zellen der NNR freigesetzt ist, kommt es im Plasma zu 90-97 % gebunden vor. Zum einen erfolgt die Bindung an das sog. *corticosteroid binding globulin* (CBG), auch Transkortin genannt, einen kleineren Teil binden es auch an Albumin, jedoch mit einer sehr viel geringeren Affinität (ORTH und KOVACS 1998). Nachdem es in die Zelle diffundiert ist, bindet es dort an intrazelluläre Rezeptoren. Die Bindung veranlasst die Umwandlung des Hormon-Rezeptor-Komplexes in ein Desoxyribonukleinsäure-(DNA)-bindendes Protein, und bindet an den Zellkern der Zelle (BURNSTEIN und CIDLOWSKI 1989). Dort agiert der Hormon-Rezeptor-Komplex als Regulator der Gentranskription. Es kommt zur Interaktion mit sog. *glucocorticoid response elements* (GRE) oder *non glucocorticoid response elements* (nGRE), die zu einer Transkription oder

Repression von Genen und somit auch der Proteinbiosynthese führen. Somit erfolgt die Wirkung von GK über die Regulation von Proteinen, welche die Funktion, Wachstum und Differenzierung von Zellen verändern, das Immunsystem beeinflussen und Verhaltensänderungen verursachen können (ORTH und KOVACS 1998).

Einige Wirkungen von GK erfolgen zu schnell, um über eine Gentranskription ausgelöst worden zu sein. Diese Wirkungen werden durch Interaktionen mit Rezeptoren im Zytosol oder auch mit der Zellmembran, ohne dass ein Rezeptor involviert ist, ausgelöst. (LOWE et al. 2008).

GK haben die Fähigkeit an den GK-Rezeptor und den MK-Rezeptor zu binden. Dies ist auf die hohe Identität in der steroid-bindenden Domain zurück zu führen. Im Gegensatz dazu, kann Aldosteron nur in sehr hohen, pathologischen Konzentrationen an den GK-Rezeptor binden. Im Blut ist die GK-Konzentration sehr viel höher als die Konzentration von Aldosteron. Durch die 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 2 (11 $\beta$ -HSD2) wird Aldosteron eine Bindung an den MK-Rezeptor ermöglicht. Sie wandelt Kortisol und Kortikosteron zu inaktiven Metaboliten um. Somit kann Aldosteron ungehindert an den MK-Rezeptor binden. In den MK-Zielgeweben, wie der Niere und dem Dickdarm, hat Aldosteron eine hohe Bindungsaffinität. In anderen Geweben, wie im Herz und im Gehirn (Hippokampus), wo die 11 $\beta$ -HSD2 nicht vorhanden ist, binden Aldosteron, Kortisol und Kortikosteron mit einer ähnlich hohen Affinität an den MK-Rezeptor (FARDELLA und MILLER 1996, PIPPAL und FULLER 2008). Welcher Mechanismus des MK-Rezeptor die Steroidbindung beeinflusst, ist noch nicht geklärt. Des Weiteren können Aldosteron und Kortisol eine Domain-Interaktion zwischen der hormonbindenden und der N-terminalen Domain des MK-Rezeptors hervorrufen, dessen physiologische Bedeutung noch nicht geklärt ist (PIPPAL und FULLER 2008).

## 2.4 Stress

### 2.4.1 Definition und Wirkungsweise

Der Begriff „Stress“ ist unspezifisch. „Stress“ stellt ein biologisches Konzept dar, dessen Hauptziel die Aufrechterhaltung der physiologischen und psychologischen Homöostase ist (LEVINE 2008).

Schon Claude Bernard (1813 – 1878) beschrieb mit dem Begriff „milieu interieur“ das innere Gleichgewicht als Konstante gegenüber der Variabilität der äußeren Einflüsse. Walter B. Cannon (1871 – 1945) fasste dies in dem Begriff Homöostase zusammen. Gleichzeitig brachte er erstmals das autonome Nervensystem in einen Kontext mit der Aufrechterhaltung des inneren Körpermilieus gegenüber äußeren Einflüssen. Er beschrieb als erster die Reaktion eines Tieres auf eine Stresssituation, das sog. „*fight or flight*“-Syndrom. Er bemerkte, dass es bei einer Aktivität des sympathischen Nervensystem und einer Ausschüttung von Adrenalin zu physiologischen Veränderungen im Körper kam, wie zum Beispiel erhöhten Blutzucker oder eine Erhöhung der roten Blutkörperchen. Solche Veränderungen identifizierte er, wenn der emotionale Stress eines Tieres erhöht war oder dieses Schmerzen hatte (CHROUSOS 1997).

Ein weiterer Wegbereiter in der Erforschung von Stress war Hans Selye. Seine Definition von 1967 lautete: „Stress ist eine nicht spezifische Antwort auf jegliche Anforderung. Dabei ist ein Stressor ein Agens, dass Stress zu jeder Zeit produzieren kann.“ Das allgemeine Anpassungssyndrom (*general adaption syndrome*, GAS) ist eine chronologische Entwicklung als Antwort auf Stressoren, wenn deren Wirkung verlängert ist. Sie teilt sich in drei Phasen auf: die Alarmreaktion, das Stadium der Resistenz oder Anpassung und das Stadium der Erschöpfung (SELYE 1976). Im ersten Stadium werden Katecholamine aus dem NNM sezerniert. In der zweiten Phase kommt es zur Aktivierung der HPA-Achse und GK werden aus der NNR ausgeschüttet. Es wird eine Gewöhnung an die veränderte Umgebung angestrebt. Im dritten Stadium, bei einem Andauern des Stressors, kann der Körper den veränderten Zustand nicht mehr kompensieren, es kommt zu pathologischen Zuständen. Im klassischen Stressmodell ist der Tod die Folge (FRANK und GRIFFIN 1989). Aus dieser Definition entstand die allgemeine



Meinung, dass jeglicher Stress zu einer unspezifischen Produktion von GK führt. Durch Experimente an Affen fand MASON (1968) heraus, dass es bei unterschiedlichen Reizen (Fasten, Hitze) zu einer unterschiedlichen Sekretion von GK-Hormonen kam. Gleichzeitig konnte er auch aufzeigen, dass sowohl eine Aktivierung des autonomen Nervensystems als auch der HPA-Achse stattfindet. Somit widerlegte er Selyes Theorie der unspezifischen Stressantwort und zeigte, dass verschiedene Antworten charakteristisch für den jeweiligen Stressor sind (MASON 1968).

Im tiermedizinischen Kontext definierten Fraser et al. (1975) Stress als eine extreme Anpassung der Physiologie eines Tieres, um mit den ungünstigen Zuständen in seiner Umwelt oder seines Managements umzugehen. Dies deutet auf die Vielschichtigkeit von Stressoren hin. Diese können entweder vom Individuum selber kommen (endogen) oder von der Umgebung des Tieres (exogen). Exogene Stressoren sind natürliche Umweltreize wie Kälte, Hitze oder Hunger. Sie können aber auch psychischer Natur (Überbelegung, Transport) oder durch den Menschen artifiziell (Schadstoffe) erzeugt sein. Es gilt auch zu unterscheiden, in welcher Dauer oder Intensität ein Stressor auf ein Individuum einwirkt. Damit kann der gleiche Reiz in einer Situation ein Stressor sein, in einer anderen wiederum nicht. Auch die genetische Variabilität einer Spezies und Erfahrungen in den ersten Lebenswochen können unterschiedlich starke Reaktionen auf Stress hervorrufen (FRASER et al. 1975, DANTZER und MORMEDE 1985, FRANK und GRIFFIN 1989).

Nicht jeder Reiz aus der Umwelt bedeutet für ein Tier eine unangenehme Situation. Er ist auch ein wichtiger und notwendiger Teil des täglichen Lebens. Ständig vorhandene Reize aus der Umwelt sind für das Überleben eines Organismus unabdingbar, so dass Veränderungen für die Leistungsfähigkeit und Aufmerksamkeit eines Individuums förderlich sein können. Stress, der den Körper positiv beeinflusst, wird somit als „Eustress“ bezeichnet (LAZARUS 1974). Wenn es jedoch einem Tier nicht möglich ist, durch eine entsprechende Antwort auf einen Stressor diesen zu eliminieren, wird dieselbe Bewältigungsantwort über einen längeren Zeitraum schädlich und kann somit als „Distress“ bezeichnet werden (LAZARUS 1974, FRASER et al. 1975, YOUNG et al. 1988).

Bei Katzen ruft emotionaler und physischer Stress eine Stimulation der HPA-Achse hervor und verursacht einen Anstieg von ACTH und Kortisol. Dabei zeigt die Katze meist Angstverhalten und Unruhe, seltener Aggressionen (KOIJAMA et al. 1995, LEVINE 2008).

#### **2.4.2 Kortisol als Stressparameter**

Seit der Stresstheorie von Hans Selye gilt eine Evaluation von Kortisol und Kortikosteron als ein Hauptindikator für die Auswirkung von Stressoren bei Tieren bzw. deren Wohlbefinden in ihrer Umgebung (LADEWIG 1994, FRANK und GRIFFIN 1989).

Kortisol ist das vorherrschende GK bei Mensch, Rind, Pferd, Schwein, Hund und Hase (IRVINE und ALEXANDER 1994, ISCHIMURA und HUIJITA 1997, BOONSTRA und TINNIKOV 1998) wie auch bei der Katze (FELDMAN 1983). Für den Menschen wurden folgende Konzentrationen bestimmt: 235 nmol/l (weiblich) und 192 nmol/l (männlich; HORROCKS et al. 1990). RAUBENHEIMER et al. (2006) dagegen bestimmte eine Konzentration von  $830,4 \pm 68,4$  nmol/l Plasma. Bei tragenden Sauen lag die Kortisolkonzentration im Plasma zwischen 62 und 173 nmol/l, wobei die maximale Konzentration einen Tag vor dem Abferkeln gemessen wurde (ÖSTERLUND et al. 1998). Die basale Konzentration des Hundes liegt zwischen 10 und 285 nmol/l Plasma (MARTIN et al. 2007). Das Rind synthetisiert beide GK, die Kortisolkonzentration im Plasma lag zwischen 1,1 – 26,8 nmol/l (THUN et al. 1981).

Bei der Katze unterliegen die Referenzwerte, die für die Kortisolkonzentration im Plasma angegeben sind, starken Schwankungen. WILLEMSE et al. (1993) gibt einen Mittelwert von  $87 \pm 16$  nmol/l an. Wohingegen KEMPPAINEN und PETERSON (1996) einen Normwert zwischen 40 bis 50 nmol/l nennen. In einer Studie von SCHOEMAN et al. (2000) werden Konzentrationen zwischen 81 und 354 nmol/l genannt. Des Weiteren nennen KRAFT und DÜRR (2005) einen Referenzwert von 41 bis 138 nmol/l. Eine Zusammenstellung der in der Literatur beschriebenen Normwerte für Kortisol ist in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1: Literaturangaben über die Kortisolkonzentration im Blut der gesunden Katze.** Erläuterung: k. A.: keine Angabe, M: Monate, J: Jahre, ZVK: Zentraler Venenkatheter (V. jugularis).

Anzahl der Katzen/ Blutentnahmeart	Geschlecht m/w (davon kastriert)	Alter (Jahre) Gewicht (kg)	Kortisolkonzentrationen Range/MW $\pm$ SD	Autor
6/ Venenpunktion	k. A.	k. A.	>8,3 – 228,5 nmol/l 196 $\pm$ 7,7 nmol/l	JOHNSTON und MATHER (1979)
6 (Laborkatzen)/ ZVK	m. 3 (3) w. 3 (3)	3 - 6 J / k. A.	87 $\pm$ 16 nmol/l	WILLEMSE et al. (1993)
112 (Laborkatzen)/ ZVK	m. 56 (14) w. 56 (19)	Median 3.5 J / 2.2 – 5.0 kg	5-140 nmol/l	PETERSON et al. (1994)
31 (Laborkatzen)/ ZVK	m. 15 (15) w. 16 (16)	1 - 5 J / 2.8 - 4.8 kg	40 - 50 nmol/l	KEMPPAINEN und PETERSON (1996)
15/ ZVK	m. 2 w. 13	1.3 -1.6 J / Median 3.4 kg	193,2 nmol/l	MOON (1997)
40 (Hauskatzen)/ ZVK	w. 40 (0)	< 2 J	5,5 – 290 nmol/l	SMITH et al. (1999)
15 (Hauskatzen)/ V. jugularis Punktion	m. 9 (9) w. 6 (6)	5 - 11 J / 5.1 - 9.0 kg	81- 354 nmol/l	SCHOEMAN et al. (2000)
20 (Laborkatzen)/ ZVK	m. 10 (10) w. 10 (10)	0.75 – 5 J/ 3.4 – 5.6 kg	5,0 – 127 nmol/l 33,9 $\pm$ 8,3 nmol/l	RAND et al. (2002)
18 (Laborkatzen)/ 18 ZVK + 7 von 18 V. jugularis Punktion	m. 7 (1) w. 11 (0)	11 M - 10.5 J 2.98 - 3.68 kg / 4 - 6 M 1.4 - 2.2 kg	Katzen < 11M 6,9 – 81,7 nmol/l Katzen $\geq$ 11 M 4,1 – 140,5 nmol/l	GREWING (2004)
130 (Hauskatzen)/ V. jugularis Punktion	m. 62 (52) w. 68 (42)	0.3 - 14.5 J	Katzen < 1.5 J 12 - 431 nmol/l Katzen $\geq$ 1.5 J 1 - 322 nmol/l	JAVADI et al. (2004)
115 (Hauskatzen)/ Punktion	k. A.	k. A.	6,9 – 388 nmol/l	KRAFT (2004)
5 (Hauskatzen)/ V. cephalica Verweilkanüle	w. 5 (0)	1 - 3 J / Median 2.5 kg	32,8 $\pm$ 18,5 nmol/l 31,8 $\pm$ 18,7 nmol/l (nach Ovariohysterektomie)	CHATDARON G et al. (2006)
			41 - 138 nmol/l	KRAFT und DÜRR (2005)

Die oben aufgezeigten Unterschiede können auf verschiedenen Faktoren beruhen, die die Konzentration des Kortisols beeinflussen. Zum einen hat das Alter einen Einfluss auf den Kortisolspiegel (KEMPPAINEN und BEHREND 1997, JAVADI et al. 2004). Auch der Grad der Sozialisierung verändert die Menge der Kortisolkonzentration im Plasma (RAND et al. 2002, JAVADI et al. 2004). Rassespezifische Unterschiede wie sie bei anderen Tierarten beobachtet wurden (Rind: VENKATASESHU und ESTERGREEN 1969; Schwein: LI et al. 2008), konnten bei Katzen nicht festgestellt werden (JAVADI et al. 2004). Ein Einfluss des Geschlechts oder einer Kastration auf die Ausschüttung von Kortisol wurde ebenfalls nicht gefunden (JOHNSTON und MATHER 1979, WILLEMSE et al. 1993, KEMPPAINEN und PETERSON 1996, JAVADI et al. 2004, CHATDARONG et al. 2006).

Schwankungen in der Serumkortisolkonzentration werden durch eine pulsatile Ausschüttung hervorgerufen. Diese erfolgen periodisch über den Tag verteilt. Beim Menschen kommt es in der Nacht und den frühen Morgenstunden (zwischen 4 und 8 Uhr) zu einer erhöhten Kortisolkonzentration, während sie am Abend einen Tiefpunkt erreicht (ORTH und KOVACS 1998). Bullen und Pferde zeigten eine ähnliche Episodik wie der Mensch (THUN et al. 1981, IRVINE und ALEXANDER 1994), beim Schaf kam es kurz nach Mitternacht zu einer maximalen Kortisolkonzentration im Plasma, die am Nachmittag ihre niedrigsten Werte erreichte (FULKERSON und TANG 1979). Bei Kaninchen verläuft die tageszeitliche Sekretion der GK umgekehrt zum Menschen und den oben genannten Tierarten. Hier erreicht die Kortisolkonzentration am Nachmittag ihren Höhepunkt und am frühen Morgen (6 Uhr) ihren niedrigsten Wert (SZETO et al. 2004). Ein ähnlicher Verlauf wurde auch beim Hamster beobachtet. Diese Spezies hatte einige Stunden vor Einsetzen der Dunkelheit die höchsten Kortisolkonzentrationen, während mit Beginn der Lichtphase die niedrigsten Konzentrationen mit Plasma gemessen wurden (ALBERS et al. 1985).

Untersuchungen zum tageszeitlichen Verlauf der Kortisolkonzentration bei der Katze wurden erstmals von KRIEGER et al. 1968 durchgeführt. In dieser Studie wurden eine tageszeitliche Rhythmik mit einem Maximum zwischen 8 Uhr abends und 4 Uhr morgens anhand von Blutentnahmen im 4-h-Rhythmus über 24 h

festgestellt (KRIEGER et al. 1968). Auch SCOTT et al. (1978) identifizierten einen tageszeitlichen Rhythmus bei der Katze. Dagegen konnten JOHNSTON und MATHER (1979) in einer Studie über einen Zeitraum von drei Tagen keine Tagesrhythmik bei der Katze feststellen. Sie untersuchten sechs Katzen beider Geschlechter mit einer Blutentnahmefrequenz von 3 h (JOHNSTON und MATHER 1979). Auswirkungen von unterschiedlich langen Photoperioden auf die Kortisolkonzentration untersuchten LEYVA et al. (1984). Es konnte kein Einfluss des Lichtregimes auf die Kortisolausschüttung beobachtet werden (LEYVA et al. 1984). In zwei verschiedenen Versuchsanordnungen wurden sowohl die episodische als auch die tageszeitliche Rhythmik von Kortisol untersucht (KEMPPAINEN und PETERSON 1996). Für die Untersuchung der episodischen Ausschüttung von Kortisol wurde 12 Katzen alle 20 Minuten in vier verschiedenen 3-h-Perioden Blut entnommen. Zur Evaluation einer tageszeitlichen Rhythmik wurde 10 Katzen in 2-h-Intervallen über 48 h Blut entnommen. Eine episodische Sekretion von Kortisol war zu erkennen (KEMPPAINEN und PETERSON 1996).

Bei Katzen kommt es zu einem Anstieg der Kortisolkonzentration bei schlechten Haltungsbedingungen, operativen Eingriffen und der damit verbundenen Anästhesie, sowie bei Zwangsfixation, wie sie in tierärztlichen Praxen häufig notwendig ist (SCHATZ und PALME 2001). WILLEMSE et al. (1993) stellten 20 min nach Zwangsfixation und anschließendem Hauttest einen Anstieg der Kortisolkonzentrationen im Plasma fest, unabhängig davon, ob eine Anästhesie durchgeführt wurde oder nicht (WILLEMSE et al. 1993). Ebenso erhöhen sich die Kortisolwerte im Blut bei Anästhesie, sowie auch bei operativen Eingriffen, wobei die Dauer des operativen Eingriffs zu einer stärkeren Kortisolausschüttung führt (SMITH et al. 1996 und 1999). Die Beurteilung von einem akuten Stressor nahmen RAND et al. (2002) vor. Nach einer fünfminütigen Dusche erhöhten sich die Kortisolkonzentrationen im Serum der Katzen um das Fünffache (von 16,6 nmol/l auf 91,1 nmol/l Plasma) und blieben über eine Stunde nach dem Stressor erhöht (82,8 nmol/l Plasma; RAND et al. 2002). Bei einer Katze kann auch die Umgebung, in der sie sich befindet, schon als Stressor empfunden werden. Gerade in Tierheimen, in einer ungewohnten Umgebung bei eingeschränkter Bewegungsmöglichkeit, werden häufig Verhaltensänderungen

und erhöhte Kortisolspiegel festgestellt (CARLSTEAD et al. 1993, McCOBB et al. 2005, GENARO et al. 2007).

### 2.4.3 Kortikosteron als Stressparameter

Kortikosteron ist das Haupt-GK bei Nagetieren (CONLEY und BIRD 1997, ISHIMURA und FUJITA, BOONSTRA und TINNIKOV 1998). Beim Menschen kommt Kortikosteron ( $58,4 \pm 9,2$  nmol/l) im Plasma 10- bis 20-mal niedriger als Kortisol ( $830,4 \pm 68,4$  nmol/l) vor, aber fast zu 40% der beiden GK in der Gehirnflüssigkeit (Liquor cerebrospinalis), und kann zu gleichen Teilen wie Kortisol über eine negative Rückkopplung ACTH hemmen (RAUBENHEIMER et al. 2006).

Das Kaninchen produziert, wie das Rind beide GK. Die Kortikosteronkonzentration beim Kaninchen erreicht am Abend (18 Uhr) einen maximalen Wert von  $83 \pm 7,2$  nmol/l Plasma und am Morgen (6 Uhr) einen Tiefpunkt von  $39,3 \pm 3,3$  nmol/l (SZETO et al. 2004). Beim Rind wurden  $82,8$  nmol/l Kortikosteron im Plasma bestimmt (VENKATASESHU und ESTERGREEN 1969). Bei der Ratte lag die Kortikosteronkonzentration im Plasma bei  $75,9 \pm 11,6$  nmol/l in der Kontrollgruppe der Studie von FILE et al. (1993).

Bei der Katze gibt es wenige Angaben über Kortikosteron. YOUNG et al. (2004) untersuchten Kortisol und Kortikosteron im Kot verschiedenen karnivoren Spezies mittels polyklonalen Antikörpern in verschiedenen Immunoassays. Es wurde ein ACTH-Stimulationstest durchgeführt, bei dem den Tieren über 6 h in 1,5-h-Intervallen je  $0,125$  mg synthetisches ACTH infundiert wurde. Nach ein bis zwei Tagen war ein Anstieg von Kortikosteron und seinen Stoffwechselprodukten von 579 % bei den männlichen Tieren und 310 % bei den weiblichen Tieren zu verzeichnen. Des Weiteren wurden die Tiere auf verschiedene Arten manipuliert, um eine Aktivierung der HPA-Achse beobachten zu können. So wurden bei den Katzen Hormoninjektionen für eine Anpaarung durchgeführt. Anschließend wurden sie anästhesiert. Kortikosteron erhöhte sich dabei nicht signifikant zu den Ausgangswerten. Dennoch korrelierten die beiden GK-Konzentrationen während des ACTH-Stimulationstest und der gesamten Versuchsdauer von 55 Tagen miteinander (YOUNG et al. 2004).

Ebenso wie Kortisol, unterliegt auch Kortikosteron einer pulsatilen und episodischen Ausschüttung. Bei der Ratte wurden die höchsten Konzentrationen am Abend (18 Uhr), mit Einsetzen der Dunkelheit gefunden, während am Morgen, um 9 Uhr die niedrigsten Werte gemessen wurden (ALLEN-ROWLANDS et al. 1980). Beim Hamster stellten ALBERS et al. (1985) eine von Licht-Dunkelphasen-abhängige Sekretion von Kortikosteron fest. Die Konzentration war bei Beginn der Lichtphase niedrig, stieg einige Stunden vor Einsetzen der Dunkelheit an und fiel dann in den letzten Stunden der Dunkelphase wieder ab. Dabei war die Kortikosteronkonzentration im Plasma in den ersten Stunden der Lichtphase höher als die des Kortisols (ALBERS et al. 1985).

Bei Ratten wurde ein signifikanter Anstieg der Kortikosteronkonzentration im Plasma festgestellt, nachdem sie für 5 min einem Angst einflößenden Stimulus (Katzengeruch) ausgesetzt gewesen waren. Die Konzentration stieg von  $75,9 \pm 11,6$  nmol/l auf  $202,9 \pm 11,6$  nmol/l Plasma an (FILE et al. 1993). Beim Mähnenhirsch (*Cervus rusa*) ergab sich bei einer Ausgangskonzentration von 2 nmol/l Plasma, ein Anstieg der Kortikosteronkonzentration nach Injektion von synthetischem ACTH von 41,4 nmol/l (MOURIK et al. 1985).

#### **2.4.4 Ratio von Kortisol und Kortikosteron als Stressparameter**

Berechnungen der Ratio von Kortisol zu Kortikosteron sind wenig beschrieben. In einer Studie von NISHIDA et al. (1977) wurde die Ratio von Kortikosteron zu Kortisol beim Menschen untersucht. Dabei wurde ihr Verhalten während eines ACTH-Stimulationstests und während eines Dexamethason-Suppressionstests beurteilt. Die Ratio stieg um das Zweifache nach Injektion von ACTH an, wobei Kortikosteron einen relativ höheren Anstieg zu verzeichnen hatte als Kortisol. Umgekehrt wurde beim Dexamethason-Suppressionstest Kortisol besser unterdrückt als Kortikosteron (NISHIDA et al. 1977). Auch RAUBENHEIMER et al. (2006) beschäftigten sich mit der Ratio von Kortikosteron zu Kortisol. Sie konnten keinen Unterschied zwischen der Sekretion von Kortikosteron und Kortisol nach einem ACTH-Stimulationstest feststellen, berechneten aber eine sehr viel höhere

---

Ratio in der Gehirnflüssigkeit ( $0,387 \pm 0,05$ ) als im Plasma ( $0,069 \pm 0,007$ ; RAUBENHEIMER et al. 2006).

BUSH (1953) gab eine Ratio von Kortisol zu Kortikosteron von 4:1 für die Katze an. Auch bei verschiedenen Tierarten wurde die Ratio von Kortisol und Kortikosteron bestimmt (ALBERS et al. 1985, MOURIK et al. 1985, ROSENTHAL et al. 1993, SZETO et al. 2004). ALBERS et al. (1985) untersuchten beim Hamster die tageszeitliche Rhythmik von Kortisol und Kortikosteron. Sie fanden sie heraus, dass die Ratio stark mit den absoluten GK-Konzentrationen korreliert. Des Weiteren konnten sie feststellen, dass sich die Ratio mit der Menge der ausgeschütteten GK erhöht, unabhängig, ob dies in akutem Stress oder während der tageszeitlichen Sekretion erfolgt (ALBERS et al. 1985). In einer Studie von VAN MOURIK et al. (1985) erhöhte sich die Ratio von Kortisol und Kortikosteron nach einer ACTH-Injektion beim Mähnenhirsch (*Cervus rusa*) von 5.31 auf 11.41. Beim Frettchen verringerte sich die Ratio nach einem ACTH-Stimulationstest von 9:1 davor auf 4:1 nach ACTH-Injektion (ROSENTHAL et al. 1993). Damit zeigte sich, dass beide Spezies beide GK produzieren, Kortisol aber dennoch das vorherrschende GK bei Mähnenhirsch und Frettchen ist (VAN MOURIK et al. 1985, ROSENTHAL et al. 1993). SZETO et al. (2004) konnte beim Kaninchen unterschiedliche Anstiege von Kortisol und Kortikosteron unter Stressbedingungen nachweisen (SZETO et al. 2004). YOUNG et al. (2004) konnten nach ACTH-Injektion einen stärkeren Anstieg des Kortikosterons in Kotproben feststellen, allerdings nur bei den weiblichen Katzen. In einer weiteren Studie wurde die Ratio von Kortisol und Kortikosteron bei der Katze berechnet (ILETT und LOCKETT 1969). Es wurde gezeigt, dass die Ratio bei Tieren vor der Geschlechtsreife unter eins lag, dieser Wert wurde aber mit zunehmendem Alter höher. Somit produzieren Jungtiere mehr Kortikosteron als ausgewachsene Tiere (ILETT und LOCKETT 1969). Weitere Angaben zur Ratio bei der Katze sind in der Literatur nicht beschrieben.



#### **2.4.5 Nicht-invasive Methoden zur Stressbestimmung**

Die Blutentnahmetechnik ist ein wichtiger Einflussfaktor, da sie selbst schon einen Stressor darstellt. So sind für die Messung von Kortisol genau kontrollierte Bedingungen erforderlich. Neben der Bestimmung von Kortisol im Plasma, werden in der Literatur verschiedene nicht-invasive Methoden zur Stressbeurteilung beschrieben. Die Katze konjugiert Kortisol hauptsächlich mit Sulfat in der Leber, die Ausscheidung erfolgt anschließend über die Galle in den Darm (GOOSSENS et al. 1995). GK und ihre Abbauprodukte werden bei der Katze zu über 80 % über den Kot ausgeschieden, beim Hund überwiegend über den Urin (GRAHAM und BROWN 1996, SCHATZ und PALME 2001).

Die Messung von Kortisol in Kotproben ist von verschiedenen Autoren beschrieben worden (SCHATZ und PALME 2001, ACCORSI et al. 2008, YOUNG et al. 2004). Da GK durch verschiedene metabolische Vorgänge als Abbauprodukte ausgeschieden werden, unterliegt eine Messung im Kot einer großen Variabilität (SCHATZ und PALME 2001). Im Vergleich zu Bestimmungen im Plasma kommt es erst nach ein bis zwei Tagen zu einer stressinduzierten Erhöhung (YOUNG et al. 2004). Dies macht Momentanbestimmung und Untersuchungen von episodischen Einflüssen nicht möglich. Dennoch ist eine Bestimmung von Kortisol im Kot ein guter Parameter zur Evaluierung des Wohlbefindens von Wildfeliden in ihrer Umgebung über einen längeren Zeitraum, da Blutentnahmen bei diesen Tieren nur unter Betäubung möglich sind und damit mit einem größerem Aufwand verbunden als bei domestizierten Katzen (YOUNG et al. 2004).

Einige Studien haben die Kortisolkonzentration im Urin oder die Kortisol-Kreatinin-Ratio (UCCR) im Urin gemessen und diese mit dem Verhaltensbeobachtungen verglichen (CARLSTEAD et al. 1993, KOJIMA et al. 1995, ZIMMER und REUSCH 2003, McCOBB et al. 2005). CARLSTEAD et al. (1993) und KOJIMA et al. (1995) konnten eine Korrelation zwischen den Kortisolkonzentrationen im Urin und ihren Verhaltensbeobachtungen feststellen. Bei ZIMMER und REUSCH (2003) dagegen war bei unterschiedlichem Verhalten von ruhig bis aufgeregt der Tiere keine Veränderung der UCCR feststellbar. Auch McCOBB et al. (2005) stellten keine

Korrelation zwischen den Verhaltensbeobachtungen und der UCCR fest. GOOSSENS et. al. (1995) haben eine Bestimmung des UCCR bei Malfunktion der HPA-Achse, sog. Hyperadrenokortizismus durchgeführt. (GOOSSENS et al. 1995). Sie konnten eine signifikante Erhöhung der UCCR bei Hyperadrenokortizismus feststellen. Da bei der Katze eine Ausscheidung der GK und ihrer Abbauprodukte hauptsächlich über die Galle erfolgt und die Ergebnisse dieser Methodik infolgedessen sehr variieren, scheint dieses Verfahren bei der Katze nur bedingt brauchbar.

Messungen der Kortisolkonzentration im Speichel sind bei der Katze bisher nicht durchgeführt worden, da sie nicht genug Speichel produziert, um eine adäquate Menge für weiterführende Untersuchungen gewinnen zu können. Zudem stellt die Entnahme für die Katze einen zusätzlichen Stressor dar. Bei Hunden, die eine gute Speichelproduktion haben, konnten eine Korrelationen der Kortisolkonzentration im Blut zu den Konzentrationen im Speichel nur unter Belastungsbedingungen gezeigt werden (AHRENS et al. 2004). In einer neueren Untersuchung von ACCORSI et al. (2008) wurden bei Hunden und Katzen Kortisolkonzentrationen von Kotproben mit Haarproben verglichen. Die Kortisolwerte in Haaren und Kot bei beiden Spezies korrelierten positiv miteinander. Die Bestimmung von Kortisol aus Haarfollikeln unterliegt durch die verschiedenen Prozesse im Haar, die noch nicht erforscht sind, einer großen Variation. So ist diese Methode, wie auch die Bestimmung der Kortisolmenge im Kot, für eine Evaluation von chronischen Stressoren geeignet (ACCORSI et al. 2008).

#### **2.4.6 Die Wirkung von Stress auf den Hämatokrit im Blut**

Als Hämatokrit wird der Anteil der zellulären Bestandteile des Blutvolumens bezeichnet. Er wird in Prozent oder Liter pro Liter Plasma (l/l) angegeben. Er wird hauptsächlich durch die Erythrozytenzahl bestimmt, da diese den Hauptteil der zellulären Bestandteile des Plasmas ausmachen (ALLEN und PATTERSON 1995).

Eine Veränderung des Hämatokrits kann auf verschiedene Arten erfolgen: entweder das Plasmavolumen reduziert sich bei gleichbleibender Erythrozytenzahl oder die Anzahl der roten Blutkörperchen erhöht sich bei gleichbleibendem Plasmavolumen (ALLEN und PATTERSON 1995). In einer akuten Stresssituation kommt es zu einer Erhöhung des Hämatokrits aufgrund der Ausschüttung von Katecholaminen. Durch die sympathische Aktivität des Nervensystems erhöht sich der Blutdruck. Dies verursacht einen erhöhten hydrostatischen Druck in den Kapillaren, was zu einer Umverteilung von Flüssigkeit vom Intravasalraum in den Extravasalraum führt. Infolgedessen steigt der Hämatokrit (ALLEN und PATTERSON 1995). KOJIMA et al. (2000) stellten diesen Zusammenhang zwischen einer Stressreaktion und dem Hämatokrit auch bei Katzen fest.

Die spontane Kontraktion der Milz und die damit verbundene Wirkung auf den Hämatokrit ist ein weiterer Faktor. Die Milz der Katze kann, wie bei anderen Tierarten auch, Erythrozyten speichern. Durch die Aktivierung des sympathischen Nervensystems wird die glatte Muskulatur in der Milzkapsel kontrahiert. Dabei entleert sie ihre Speicher, so dass sich die Anzahl der im Blut zirkulierenden roten Blutkörperchen relativ zum gleichbleibenden Blutvolumen erhöht. Die Milz der Katze kann 20 % der zirkulierenden Erythrozyten speichern und bei Bedarf ausschütten (TVEDTEN 1981, BREZNOCK und STRACK 1982a und 1982b, STEWART und MCKENZIE 2002).

Auch GK beeinflussen durch ihre mineralokortikoide Wirkung den Hämatokrit. Durch die Förderung der Natriumretention in der Niere kommt es zu einer Erhöhung der Serumnatriumkonzentration. Dadurch steigt das Plasmavolumen und es kommt zu einer relativen Erniedrigung des Hämatokrits. (AURICH 2002). Damit können sie bei länger anhaltender Stressreaktion der Hämatokrit-steigernden Wirkung der Katecholamine entgegen wirken.

#### **2.4.7 Der ACTH-Stimulationstest zur Beurteilung der Hypophysen-Hypothalamus-NN Achse bei der Katze**

Die Messung der Effekte von exogenem zugeführtem ACTH ist eine verlässliche Methode zur Evaluation der HPA-Achse (NISHIDA et al. 1977, FELDMAN 1983, SMITH und FELDMAN 1987). Auch bei der Katze kann der ACTH-Stimulationstest angewandt werden um die damit verbundene vermehrte Ausschüttung von GK aus der NN zu untersuchen.

Meist ist ein Anstieg der Kortisolkonzentration im Serum nach 20 bis 60 min zu verzeichnen. GENARO et al. (2007) berichteten von einem Anstieg 5 min nach der i. v. Injektion von synthetischem ACTH. Die maximale Konzentration von Kortisol ist zwischen 30 und 90 min erreicht und nähert sich nach 120 bis 180 min wieder den Ausgangskonzentrationen an (SMITH und FELDMAN 1987, SCHOEMAN et al. 2000, CHATDARONG et al. 2007). Lediglich bei JOHNSTON und MATHER (1979) waren bei zwei Katzen 4 h nach ACTH-Injektion die Kortisolkonzentrationen noch nicht wieder gefallen.

Verschiedene Autoren verglichen den Anstieg der Kortisolkonzentration nach Injektion unterschiedlicher Mengen von synthetischem ACTH. Es wurde eine Dosis von 0,125 mg ACTH pro Katze oder von 0,25 mg ACTH pro Katze i. m. oder i. v. injiziert. Signifikante Unterschiede im Anstieg der Kortisolkonzentration konnten zwischen diesen beiden ACTH-Dosierungen und Injektionsarten nicht festgestellt werden (SMITH und FELDMAN 1987, SCHOEMAN et al. 2000, CHATDARONG et al. 2007). SCHOEMAN et al. stellten aber fest, dass der Anstieg der Kortisolkonzentration nach einer Injektion von 0,25 mg ACTH pro Katze länger andauerte.

Eine physiologische Funktion der NN ist gewährleistet, wenn die Kortisolkonzentration 30 bzw. 60 min nach ACTH-Injektion zwischen 138 und 331 nmol/l Plasma liegt (TVEDTEN und WILLARD 2006). KRAFT und DÜRR (2005) gaben eine obere Grenze von 497 nmol/l Plasma an.

## 2.5 Stressfreie Blutentnahme bei Tieren

### 2.5.1 Das Venous Access Port System

Zum Einsatz eines total implantierten Kathetersystems, dem sog. *venous access port* (VAP)-System, kommt es in der Humanmedizin seit den frühen 1980er Jahren (NIEDERHUBER et al. 1982). Das VAP-System besteht aus einem Venenkatheter (Silikon oder Polyurethan) und einer subkutan implantierten Portkammer (Titan oder Plastik). Diese wird mittels einer Hubernadel (spezielle Nadel mit abgeknicktem Ende) durch eine Silikonmembran injiziert. Damit stellt das VAP-System einen permanenten Zugang zum Gefäßsystem her und macht es möglich, Flüssigkeiten und Medikamente einfach, leicht und dauerhaft intravenös zu verabreichen. Ein großes Einsatzgebiet liegt in der Chemotherapie von Langzeitkrebspatienten, in der Dialysetherapie und bei Bluttransfusionen. Vorteile des Portkatheters gegenüber konventionellen Verweilkathetern sind eine geringere Infektionsrate, eine geringere Thromboseentwicklung und eine größere Mobilität des Patienten (KOCK et al. 1998, BALLARINI et al. 1999). Zudem sind sie einfach zu implantieren. Bei Erwachsenen wird dieser Eingriff minimal invasiv unter lokaler Betäubung durchgeführt. Häufigste Komplikationen postoperativ sind: Infektionen, Thrombosen und Dislokationen der Portkammer oder des Katheters. Die Komplikationsrate liegt zwischen 10 und 15%. (KOCK et al. 1998).

Auch in der Tiermedizin kommt es zu Verwendung von Portkathetern. Hier werden sie in der Versuchstierkunde eingesetzt, aber auch in der Langzeitanwendung von Chemotherapeutika oder Infusionen, sowie bei der parenteralen Ernährung und bei Bluttransfusionen spielen sie inzwischen eine Rolle (CAHALANE et al. 2007, MORRISON 2007 et al., GRAHAM et al. 2008). Ein Hauptgrund für die Verwendung von VAP-Systemen ist die Reduktion der Stressantwort bei Tieren und die damit verbundene bessere Kooperationsfähigkeit. Zugleich werden stressbedingte Veränderungen von Blutparametern, die Studienergebnisse falschpositiv oder –negativ beeinflussen könnten, reduziert. Auch perivasale Injektionen und damit verbundene Gewebnekrose, besonders bei kleinen Tieren, können so verhindert werden (PERRY-CLARK und MEUNIER 1991, TESCHE et al. 2002).

Von Bedeutung ist das VAP-System auch bei Großtieren, wie Affen oder Schweinen, die sich nach der Implantation weiterhin in ihren sozialen Gruppen aufhalten können. Durch die geringe Schmerzhaftigkeit bei der Blutentnahme oder Medikamentengabe ist die Toleranz und Zusammenarbeit bei den Tieren größer als bei konventionellen Kathetersystemen. Da Schweine eine sehr dicke Haut besitzen und die Blutentnahme meist blind erfolgt, bietet sich das VAP-System für mehrmalige Entnahmen bei dieser Tierart im Versuchstierbereich besonders an (BAILIE et al. 1986, GRAHAM et al. 2008).

### **2.5.2 Anwendung des VAP bei der Katze**

Zwei Möglichkeiten der Implantation des VAP-System sind bei der Katze beschrieben. Zum einen wird der Katheter über die Vena jugularis externa in die vordere Hohlvene (Vena cava cranialis) eingeführt und kommt vor oder im rechten Herzvorhof zum Liegen. Die Portkammer wird an der gleichen Halsseite befestigt (HENRY et al. 2002, MORRISON et al. 2007). Eine zweite Möglichkeit ist der Zugang über die Vena femoralis. Dabei kommt der Katheter im abdominalen Teil der hinteren Hohlvene (Vena cava caudalis) zum Liegen. Die Portkammer wird in diesem Fall im hinteren Brustbereich oder lateral am Oberschenkel unter der Haut befestigt (WEBB et al. 1995, CAHALANE et al. 2007).

WEBB et al. implantierten VAP-Systeme für Blutentnahmen und pharmakokinetische Studien bei 35 Katzen in die Vena femoralis. Sie verwendeten sog. *retention beats*, kleine olivenförmige Verstärkungen zur Fixation des Katheters im Gefäß. Diese verhindern ein Herausrutschen des Katheters und damit verbundene perivaskuläre Blutungen. Die beschriebene Funktionsdauer lag zwischen einem bis acht Monate (WEBB et al. 1995).

Da Katzen im Handling nicht einfach sind und auch ungern über einen längeren Zeitraum ruhig sitzen bleiben, ist der VAP für die Anwendung bei Blutspendetieren sinnvoll. MORRISON et al. (2007) sahen darin einige Vorteile: das Portsystem wurde von den Tieren sehr gut toleriert und es war bei der Entnahme nur eine minimale Fixierung des Tieres notwendig. Dadurch dass nicht die Vene direkt erneut punktiert wurde, verminderte sich auch das Risiko von Irritationen am

Gefäß. Eine Blutspendekatze mit einem implantierten VAP konnte zuhause gehalten werden, dies war aus Tierschutzgründen sehr vorteilhaft.

HENRY et al. (2002) untersuchten hämatologische und biochemische Parameter im Blut, das über das VAP-System entnommen wurde und verglichen es mit Blutproben einer konventionellen Venenpunktion. Dabei stellten sie fest, dass vom VAP entnommenes Blut keine Unterschiede zu den Blutparametern einer herkömmlichen Venenpunktion aufzeigte. In dieser Studie waren bei 14 Katzen, die über 3,5 Monate ein VAP-System implantiert hatten, keine Komplikationen aufgetreten (HENRY et al. 2002).

Die Lokalisation im hinteren Körperbereich ist sinnvoll, wenn im Brustbereich operiert werden muss oder eine Strahlentherapie vorgenommen werden muss. CAHALANE et al. (2007) untersuchten deshalb die Praktikabilität der Befestigung der Portkammer am lateralen Oberschenkel bzw. alternativ an der hinteren Brustwand bei drei Hunden und sechs Katzen. Im Rahmen eines Tumortherapiemanagements, wurden die Tiere entweder bestrahlt oder bekamen Chemotherapeutika über das VAP-System injiziert. Sie stellten fest, dass es wichtig ist, ein festes Gewebe als Unterlage für die Portkammer zu finden um den Gegendruck beim Einführen der Hubernadeln standhalten zu können. Deswegen empfanden sie die Implantation bei adipösen Tieren als problematisch, da eine Fixation der Portkammer sich schwieriger gestaltete. Zudem musste eine Palpation gewährleistet bleiben. Sie empfahlen, ein Stück Gewebe mit zu entfernen. Die Lokalisation im hinteren Körperbereich erwies sich bei widerspenstigen Tieren als vorteilhaft. In dieser Studie traten verschiedene Komplikationen auf: Thrombenbildung, Katheterokklusion und ein Abknicken des Katheters wurden beobachtet. Das Portsystm wurde in dieser Studie im Mittel 4,8 Monate belassen (CAHALANE et al. 2007).

## 2.6 Schlussfolgerung für die eigene Zielsetzung

In der Literatur gibt kaum Informationen zur Kortikosteronkonzentration bei der Katze. Lediglich YOUNG et al. (2004) untersuchten neben der Kortisolkonzentration, auch die Kortikosteronkonzentration in Kotproben von Katzen. Dabei stellten sie einen deutlichen Anstieg (siehe 2.4.3) ein bis zwei Tage nach ACTH-Injektion fest. Bei anderen Tierarten, wie dem Hamster oder dem Kaninchen stellte sich nach Untersuchung der Kortisol- wie auch der Kortikosteronkonzentration signifikante Unterschiede im Sekretionsmuster und in der Konzentrationsmenge heraus (ALBERS et al. 1985, SZETO et al. 2004). Durch die Untersuchungen von BUSCH (1953) und YOUNG et al. (2002) war bekannt, dass die Katze auch Kortikosteron bildet. So stellte sich für die eigene Untersuchung die Frage, wie sich die Kortikosteronkonzentration unter Einfluss eines Stressors und unter physiologischen Bedingungen im Vergleich zur Kortisolkonzentration verhält und ob sich daraus präzisere Aussagen auf die Reaktion auf einen milden Stressor machen ließen.

ALBERS et al. (1985) zeigten, dass die Ratio aus Kortisol und Kortikosteron mit den absoluten GK-Konzentrationen im Plasma korrelierte. Sie stellten auch fest, dass die Ratio sich sowohl unter Einwirkung eines akuten Stressors, sowie in der tageszeitlichen Sekretion mit der Menge der ausgeschütteten GK erhöht. Daraus ließ sich erkennen, dass es die Berechnung der Ratio einen weiteren Parameter zur Beurteilung der Sekretion und Verteilung der GK im Plasma darstellen könnte. Eine Berechnung der Ratio sowohl unter der Einwirkung eines milden Stressors als auch unter Ruhebedingungen erschien in den eigenen Untersuchungen als sinnvoll.

Einige Autoren wiesen bei der Katze einen tageszeitabhängigen Verlauf in der Kortisolkonzentration im Plasma nach (KRIEGER et al. 1968, SCOTT et al. 1978). Andere Studien dagegen widerlegten dies, da sie keine Tagesrhythmik in der Kortisolkonzentration bei der Katze feststellen konnten (JOHNSTON und MATHER 1979, LEYVA et al. 1984). KEMPPAINEN und PETERSON (1996) wiesen eine episodische Sekretion von Kortisol bei der Katze nach, einen tageszeitabhängigen Verlauf jedoch nicht. Aufgrund der unterschiedlichen



Ergebnisse stellte sich die Frage, inwieweit die Katze, neben der episodischen Sekretion der GK, eine tageszeitliche Rhythmik in der Sekretion von Kortisol und auch von Kortikosteron haben könnte. Eine weitere Fragestellung war auch, ob die Bestimmung der Kortikosteronkonzentration und die Berechnung der Ratio aus den beiden GK mehr Informationen diesbezüglich liefern würden.

Da alle drei Parameter auch unter der Einwirkung eines milden Stressors evaluiert werden sollten, schien ein Duschbad von 3 min dafür die richtige Wahl. Dieser milde Stressor fand schon in der Studie von RAND et al. (2002) Anwendung. Er ist leicht durchführbar, wiederholbar, zeitlich begrenzt und somit ethisch als ein milder Stressor bei Katzen akzeptiert (RAND et al. 2002).

### **3. Tiere, Material und Methoden**

#### **3.1 Förderung und Genehmigung des Forschungsprojekts**

Dieses Forschungsprojekt wurde von der Edith-Haberland-Wagner-Stiftung finanziell gefördert und unterstützt.

Aufgrund der frequenten Blutentnahme und der Behandlung der Tiere handelte es sich um einen genehmigungspflichtigen Tierversuch. Dieser wurde am 11.06.2008 von der Regierung von Oberbayern in seiner endgültigen Form genehmigt (Aktenzeichen 55.2154-2531-102-07).

#### **3.2 Tiere**

Für die vorliegende Studie standen Katzen der Rasse Europäisch Kurzhaar zur Verfügung. Alle Katzen stammten aus einer französischen Versuchstierzucht (Charles River Laboratories), waren kastriert und waren im Oktober 2005 geboren. Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren sie zwischen 33 und 35 Monate alt. Für den Versuch wurden 16 Tiere, davon acht männliche, mit einem Gewicht von 4,4 bis 5,9 kg, und acht weibliche Katzen, mit einem Gewicht von 3,0 bis 3,8 kg, verwendet. Die Tierversuchshaltung war gemäß §11 des Tierschutzgesetzes genehmigt. Alle Tiere befanden sich vor der Studie in Gruppenhaltung von sechs bis acht Tieren unter gleichen Bedingungen: nach Geschlecht getrennt, mit Schlafplätzen, Nippeltränke und Katzentoilette (Katzenstreu aus dem Handel mit Sägemehl gemischt). Gefüttert wurde morgens mit einem kommerziellen Katzentrockenfutter, die Kater bekamen zusätzlich zur Harnsteinprävention Hill's™ Trockenfutter prescription diet c/d beigemischt. Gelegentlich wurden Spielbälle integriert. Eine Reinigung der Gehege erfolgte täglich. Die Raumtemperatur betrug 19°C. Mehrere Fenster dienten als Lichtquellen tagsüber, abends konnten Neonröhren eingeschaltet werden. Für die Dauer des Versuches verblieben die Tiere in Einzelkäfighaltung. Jeder Einzelkäfig war mit einer Katzentoilette, einer Nippeltränke, einem Fressnapf und einer erhöhten

Liegefläche ausgestattet. Als *environmental enrichment* wurden für die Katzen in leeren Toilettenpapierrollen versteckte Futterstückchen präpariert.

**Tabelle 2: Liste der in der Untersuchung verwendeten Katzen mit den Angaben der Chipnummer (letzte 4 Stellen), Geschlecht, Gewicht und Geburtsdatum (Stand Mai 2008).**

<b>Nummer</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Gewicht in kg</b>	<b>Geburtsdatum</b>
6564	männlich	5,9	10. Okt 05
6559	männlich	4,4	10. Okt 05
2127	männlich	5,8	10. Okt 05
2128	männlich	4,8	12. Okt 05
2125	männlich	4,7	10. Okt 05
2120	männlich	4,7	12. Okt 05
6566	männlich	4,5	12. Okt 05
6563	männlich	5,1	10. Okt 05
2031	weiblich	3,3	10. Okt 05
2032	weiblich	3,0	04. Okt 05
2040	weiblich	3,7	07. Okt 05
6549	weiblich	3,6	10. Okt 05
6565	weiblich	3,7	10. Okt 05
6567	weiblich	3,8	10. Okt 05
6558	weiblich	3,2	12. Okt 05
6568	weiblich	3,1	14. Okt 05

### 3.3 Versuchsaufbau

Ziel des Versuches war eine Bestimmung der Konzentration der Glukokortikoide (GK) Kortisol und Kortikosteron im Plasma von Katzen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC). Aus beiden GK sollte die Ratio errechnet werden. Dies sollte in zwei verschiedenen Untersuchungen geschehen: im ersten Versuch sollte die Stressreaktion durch die Einwirkung eines milden Stressors beurteilt werden. Dazu wurden den Tieren in frequenten Abständen Blut entnommen. Nach 90 min wurden die Tiere für 3 min geduscht und es wurden anschließend erneut 90 min Blut entnommen. Der zweite Versuch erstreckte sich über 24 h mit Blutentnahmen alle 2 h.

Um die Blutentnahme so stressfrei wie möglich zu gestalten und keine zusätzliche Stressreaktion durch Zwangsfixation zu verursachen, wurde allen Tieren ein spezieller zentraler Venenkatheter in die Vena jugularis implantiert. Dieses *venous access port system* (VAP-System) bestand aus einem Polyurethan Katheter und einer Kammer die unter der Haut fixiert wurde, so dass an der seitlichen Thoraxwand aus dieser Kammer, Blut entnommen werden konnte. Die Gruppe von 16 Katzen wurde zudem in zwei Versuchsgruppen unterteilt: die acht Kater wurden dem Stressversuch mit Dusche unterzogen, die acht weiblichen Tiere wurden im 24 h Profil eingesetzt. So konnten geschlechtliche Unterschiede bezüglich der Blutkonzentrationen von Kortisol und Kortikosteron ausgeschlossen werden.

Zudem wurde bei allen Tieren vor dem eigentlichen Versuchsbeginn die physiologische Funktion der Nebenniere (NN) untersucht. Ein adrenokortikotropes Hormon (ACTH)-Stimulationstest mit Blutentnahmen vor, 45 und 90 min nach der ACTH-Injektion wurde durchgeführt.

### 3.3.1 ACTH-Stimulationstest

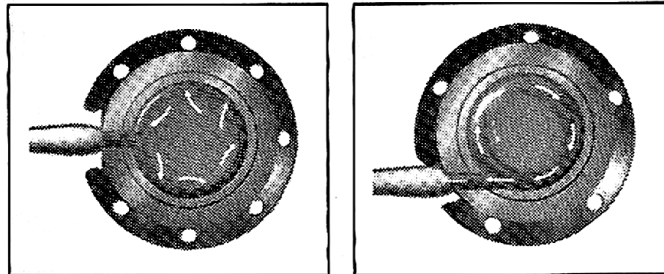
Alle Tiere wurden vor Versuchsbeginn auf eine physiologische Funktion der Nebenniere und der Hypothalamus-Hypophysen-NN Achse (engl. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*, HPA-Achse) getestet. Den Katzen wurde um 12:30 Uhr mit einer 22G (0,6 x 40 mm Kanüle ca. 2,4 ml Blut aus der Vena saphena medialis entnommen. Sofort nach der ersten Blutentnahme wurde 0,125 mg synthetisches ACTH (Synacthen<sup>®</sup>, Fa Novartis Deutschland GmbH) pro Tier (0,5 ml/Tier) intramuskulär (i. m.) appliziert. Dies erfolgte zur gleichen Uhrzeit wie die Einwirkung des milden Stressors Dusche im Stressversuch. Weitere Blutentnahmen erfolgten 45 min (13:15 Uhr) und 90 min (14:00 Uhr) nach ACTH-Applikation. Die letzte Blutentnahme des ACTH-Stimulationstests war somit zur gleichen Uhrzeit wie die letzte Blutentnahme des Stressversuchs. Das Blut wurde in Lithium-Heparin-Röhrchen aufgefangen und in einer Eisbox gekühlt.

Der Hämatokritwert jeder Probe wurde unmittelbar nach der Entnahme bestimmt, anschließend wurde das Blut 10 min bei 4 °C und 2000 *g* zentrifugiert. Vor Ort wurde nach dem Zentrifugieren je 570 µl des gewonnenen Plasmas in Eppendorfcups (1,5 ml) abpipettiert und zur späteren Analyse bei -80 °C tiefgefroren. Die Proben wurden mittels HPLC ausgewertet (siehe 3.3.2).

### 3.3.2 Portimplantation

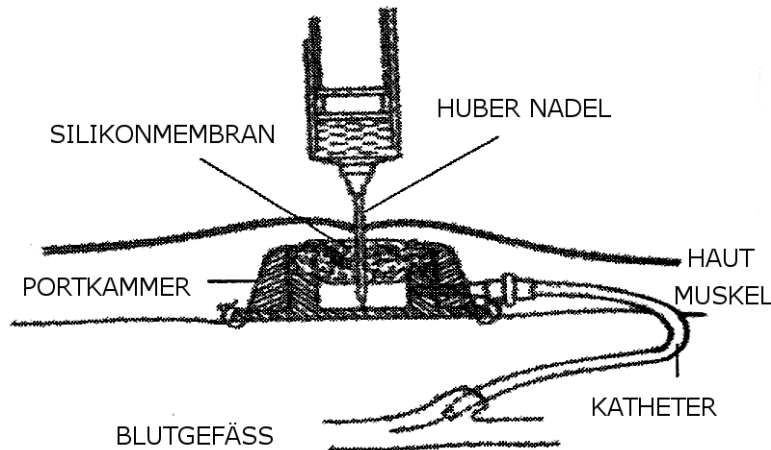
Um eine möglichst stressfreie Blutentnahme gewährleisten zu können, wurde ein VAP-System verwendet. Dadurch mussten die Tiere nicht zwangsfixiert werden und konnten von einer sitzenden Person auf dem Arm gehalten werden. Das VAP-System bestand aus einem *Hydrocoat* Katheter (Polyurethan mit Hydromer beschichtet und mit abgerundeter Spitze, Fa Norfolk Medical, Skokie, IL, USA) und einer Titanportkammer mit konvexer Silikonmembran (ClearPort<sup>™</sup>, Fa Norfolk Medical, Skokie, IL, USA). Diese war in zwei Größen verfügbar: Clearport<sup>™</sup> 4 (Gewicht 8 g, Volumen 0,25 ml) und Clearport<sup>™</sup> 6 (Gewicht 3 g, Volumen 0,20 ml). Portkammer und Katheter wurden über die Firma UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, NL bezogen. Aufgrund ihrer kreisrunden Form und einem tangentialen

Austritt bzw. Eintritt des Blutstroms, kam es zu einem spiralenartigen Blutfluss in der Kammer. Dies gewährleistete, dass die Totraumbildung und die Bildung von Thromben im System minimiert wurden.



**Abbildung 3: Strömungsverhältnisse eines konventionellen Ports und des Clearport™.** Durch den tangentialen Eintritt des Blutstroms werden Totraumbildung und Bildung von Thromben vermindert. Mit freundlicher Genehmigung der Fa. UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, NL.

Zur intravenösen Fixierung des Katheters in der gewünschten Länge konnten sog. *retention beats*, kleine olivenförmige Verstärkungen entlang des Katheters, in selbst gewählten Abständen festgelegt werden. Zur Blutentnahme und Spülung der Katheter wurde die speziell hierfür vorgesehene Hubernadel verwendet. Ihr Ende war speziell geschliffen, so dass die Öffnung zur Seite anstatt nach unten zeigte. Dies garantierte, dass die Silikonmembran des Ports durch die Hubernadel, nur verdrängt und nicht ausgestanzt wurde. So wurde die Gefahr von Infektionen oder einer Undichtigkeit des Systems minimiert.



**Abbildung 4: schematische Darstellung des *venous access port system* (VAP).** Zu sehen ist die unter der Haut liegende Portkammer mit eingesteckter Hubernadel. Aus der Portkammer führt der Katheter in das Blutgefäß. Mit freundlicher Genehmigung der Fa. UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, NL.

### 3.3.2.1 Portauswahl und Kathetereigenschaften

Das kleinere Modell des Clearports™ (CP6) wurde den acht weiblichen Tieren implantiert, da diese kleiner und von zierlicher Statur waren. Die größeren und schwereren Kater bekamen das große Modell (CP4) eingesetzt. Alle Tiere erhielten zu den jeweiligen Portkammern Katheter der Größe 3,5 french. Die *retention beats* zur Befestigung des Katheters in der Vene war bei den männlichen Tieren 10 cm, bei den weiblichen Tieren 8 cm von der Katheterspitze entfernt. Die Spülung und Blutgewinnung erfolgte immer unter aseptischen Bedingungen.

### 3.3.2.2 Operationstechnik

Die Implantation des venösen Zugangssystems fand im Zentrum für präklinische Forschung (ZPF) am Klinikum Rechts der Isar München unter Leitung von Frau Dr. Christine Baumgartner, Herr Prof. Wolf Erhardt und Frau Dr. Anne-Kathrin Preissel statt.

Am Tag der Operation wurden die Tiere morgens nüchtern nach München ins ZPF gebracht. Zur Narkoseprämedikation wurden 0,04 mg/kg Atropin (Atropin EDO®)

intramuskulär (i. m.) injiziert. Anschließend wurde folgende teilantagonisierbare intramuskuläre Injektionsnarkose verabreicht: 0,5 mg/kg Midazolam (Dormicum<sup>®</sup>, Fa. Roche Pharma AG), 0,03 mg/kg Medetomidin (Dormitor<sup>®</sup>, Fa. Pfizer Pharma GmbH) und 3 mg/kg Ketamin (Ketavet<sup>®</sup>, Fa. Pfizer Pharma GmbH). Anschließend wurde ein venöser Zugang an der V. saphena medialis geschaffen (Venovenweilkatheter). Um eine schmerzfreie Narkose zu gewährleisten und um den Tieren eine ruhige und schmerzfreie Aufwachphase nach dem Eingriff zu verschaffen, wurden 40 mg/kg Metamizol (Novalgin<sup>®</sup>, Fa. Aventis Pharma SA) intravenös (i. v.) injiziert. Die Katze wurde am linken Hals und Thoraxbereich nass rasiert und gewaschen. Es erfolgte die Intubation der Katze. Die Narkose wurde mit 2 mg/kg Propofol (Disoprivan<sup>®</sup>, Fa. AstraZeneca GmbH) intravenös nach Bedarf als Bolus fortgeführt. Die Narkoseüberwachung geschah mittels Elektrokardiogramm und Pulsoxymeter. Das Operationsfeld wurde steril abgedeckt. Eine Schnittinzision der Haut erfolgte an der linken Halsseite über der palpierbaren Vena jugularis. Diese wurde anschließend freipräpariert. Zwei Sicherungsfäden (3-0 Vicryl 45 cm ohne Nadel, Fa. Ethicon) wurden in 1 cm Abstand unter die Vene gelegt, die daraufhin mittels einer mikrochirurgischen Schere eingeschnitten wurde. Mit Hilfe eines Mandrins einer Vasofix<sup>®</sup> Braunüle<sup>®</sup> der Größe 20 G als Führungshilfe wurde der Katheter in die Vene eingeführt. Es wurde eine vorläufige Fixation des Katheters an dem *retention beat* vorgenommen. Durch C-Bogen Kontrolle und Injektion von 1-2 ml eines Kontrastmittels (Imeron<sup>®</sup> Injektionslösung, Fa. Altana Pharma AG) wurde evaluiert, wie weit die Katheterspitze vom Herz entfernt liegt. Angestrebt wurde ein Abstand von 2 cm präkardial.

Im nächsten Schritt wurde die Haut am lateralen Thorax in einer Länge von 2 cm dorsoventral eröffnet und nach kaudal stumpf zu einer Tasche erweitert. Mit einer scharfen Hohladel (15 cm und 4 mm Durchmesser) wurde subkutan ein Tunnel zwischen beiden Inzisionen angelegt, durch den das Katheterende vom Hals zum Thorax geführt wurde. Nach Adaptation des Katheters an die Portkammer durch den sog. *attachment sleeve*, einer die Verbindungsstelle überlappenden Schlauchmanschette, wurde diese an vier Stellen unter der Haut fixiert. Anschließend wurde das System noch einmal auf Durchgängigkeit in beide



Richtungen geprüft. Die Haut wurde mit einer Intrakutannaht (3-0 Vicryl FS-1 mit scharfer Nadel und antibakterieller Beschichtung, Fa. Ethicon) verschlossen.

Die Tiere wurden am gleichen Tag zurück in die Versuchstierhaltung verbracht und antibiotisch (1 mg/kg Amoxicillin, Duphamox<sup>®</sup>, Fa. Ford Dodge Animal Health) sowie analgetisch (4 mg/kg Carprofen, Rimadyl<sup>®</sup>, Fa. Pfizer Pharma GmbH) für weitere zwei Tage versorgt. Eine tägliche Wundkontrolle und eine sterile Portkatheterpflege wurden durchgeführt. In der ersten Woche wurde das Portsystem täglich mit ca. 3 ml NaCl-Heparinlösung (0,9 % NaCl, 100 IE/ml Heparin-Natrium-25000 ratiopharm<sup>®</sup>) mittels Hubernadel und 5 ml Spritze gespült, um einen freien Durchfluss zu gewährleisten. Nach sechs Tagen wurde die Katheterpflege auf jeden zweiten bis dritten Tag reduziert.

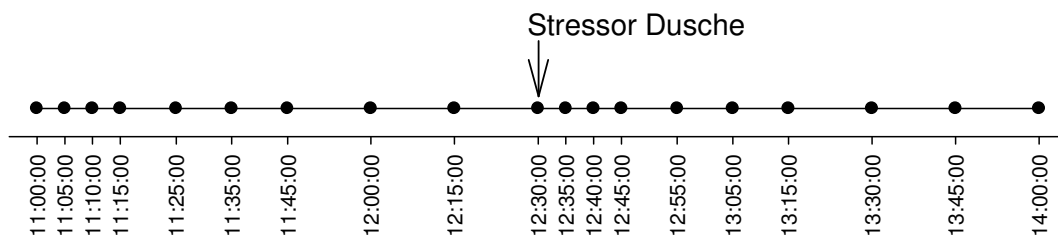
Das VAP-System wurde 10 Tage nach Versuche unter Allgemeinanästhesie und unter sterilen chirurgischen Bedingungen entfernt und die Katzen anschließend in ihr Gruppengehege zurückgesetzt.

### **3.3.3 Adaptation der Tiere an die Versuchsbedingungen**

Da es sich um Versuchskatzen handelte, waren die Tiere nicht sehr an das Handling durch den Menschen gewöhnt, und es war nötig, sie anzutrainieren. Ziel dabei war es, dass eine Person in der Lage war, die Katze ohne große Fixierung sicher und zuverlässig zu halten, damit die Katze eine möglichst geringe Stressreaktion zeigen würde. Die Tiere wurden daher schon vor und während der postoperativen Pflege und der Spülung der Katheter länger als nötig auf dem Arm gehalten, gestreichelt und mit kleinen Futterrationen gefüttert, damit sie diesen Zustand als positiv memorisieren. Durch diese positive Erfahrung sollte erreicht werden, dass jedes Tier auch bei den folgenden Behandlungen ruhig auf dem Arm verweilen würde.

### 3.3.4 Stressversuch

Die Probandengruppe für diesen Versuch erstreckte sich auf acht männliche Tiere. Der Versuch wurde zwischen 10 bis 15 Tagen nach der Portimplantation durchgeführt, um eine angemessene Wundheilung und Erholung der Tiere zu garantieren. Es befand sich pro Tag ein Kater im Versuch. Versuchsbeginn war jeweils 11 Uhr, Versuchsende 14 Uhr. Dazwischen lagen 19 Blutentnahmen ( $t = 0 \text{ min}$  bis  $t = 180 \text{ min}$ ; Abb. 5):



**Abbildung 5: Zeitliche Darstellung des Stressversuchs.**

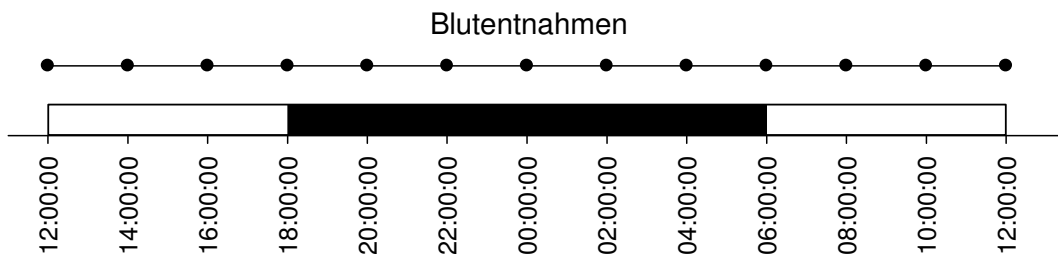
Die Tiere wurden während der Blutentnahmen von einer sitzenden Person in einer möglichst stressfreien Position gehalten und bei Bedarf mit Trockenfutter oder Vitaminpaste gefüttert. Wenn die Entnahmeabstände nur 5 Minuten oder nur 10 Minuten betragen, wurde versucht, die Hubernadel in der Portkammer stecken zu lassen und mit einem dafür vorgesehenen Deckel zu verschließen. Dazu musste der Kater auf dem Arm verbleiben. Bei zu großer Unruhe wurde die Hubernadel entfernt, und der Kater zwischen den Entnahmen wieder in ihren Käfig gesetzt. Nach jeder Blutentnahme erfolgte eine Spülung des Systems.

Um 12:30 Uhr, zum Zeitpunkt  $t = 90 \text{ min}$ , wurde der jeweilige Kater direkt nach der Blutentnahme in einen Zwangskäfig (45 x 30 x 30 cm) gesetzt und von oben mittels eines Duschkopfes in einem Waschbecken drei Minuten lang geduscht. Dies erfolgte bei mittlerer Strahlhärte und einer Wassertemperatur zwischen 22 und 24 °C. Anschließend wurde das Tier abgetrocknet und es folgte die elfte

Blutentnahme (t = 95 min, 12:35 Uhr). Das Versuchstier wurde am nächsten Tag wieder in die Gruppengehegehaltung verbracht.

### 3.3.5 24 h Profil

Für diesen Versuch wurden acht weibliche Katzen ausgesucht, denen innerhalb von 24 h alle 2 h Blut entnommen wurde. Der Versuch wurde auf zwei Tage aufgeteilt, so dass jeweils vier Katzen pro Versuchstag vorgesehen waren. Der Versuch fand, wie auch der Stressversuch, im September statt, so dass ein 12 h Tag-/12 h Nacht-Rhythmus gegeben war. Es wurde eine geringst mögliche Belastung durch Weißlicht angestrebt, so dass die Katzen während der Dunkelphase (18 Uhr bis 6 Uhr) nicht durch eine starke Ausleuchtung gestört wurden (Abb. 6). Die Tiere wurden während der Entnahme von einer sitzenden Person möglichst stressfrei gehalten. Die erste Blutentnahme für alle Katzen war um 12 Uhr mittags, es folgten 12 weitere Blutentnahmen im Abstand von 2 h, so dass die letzte und damit dreizehnte Blutentnahme um 12 Uhr des folgenden Tages stattfand (Abb. 6).



**Abbildung 6: zeitliche Darstellung des 24 h Profils (vier Katzen/Tag).** Der schwarze Balken markiert die Dunkelphase.

### **3.4 Bestimmung der Konzentrationen von Kortisol und Kortikosteron im Blut der Katzen**

#### **3.4.1 Blutentnahme und Probenaufbereitung**

Es wurden in beiden Versuchen, Stresstest und 24 h Profil, ca. 2,4 ml Blut mit einer Hubernadel und einer 5 ml Spritze über die Portkammer an der seitlichen Thoraxwand entnommen. Das Blut wurde sofort in eine 4,5 ml Lithium-Heparin Monovette (Fa. Sarstedt) gegeben und sorgfältig geschwenkt. Die Heparinkonzentration wurde vor der Blutentnahme der geringeren Blutmenge von 2,4 ml Blut angeglichen. Dazu wurde die Hälfte der mit Heparin beschichteten Kügelchen entfernt. Nach jeder Entnahme erfolgte eine Spülung des Kathetersystems mit NaCl- oder NaCl-Heparin-Lösung. Anschließend wurde der Hämatokrit jeder Probe bestimmt (Mikrohämatokritmethode), um die Beeinflussung der Erythrozytenkonzentration durch die Blutentnahmen zu erfassen.

Die Proben wurden 10 min bei 4 °C und 2000 *g* zentrifugiert und vom gewonnenen Plasma wurden in 570 µl in Eppendorfcups abpipettiert. Die ersten drei Proben bei jeder Katze in jeder Versuchsreihe (Stressversuch und 24 h Profil) wurden steril abpipettiert und für eine eventuell notwendige Resuspension vorbereitet. Dazu wurde nach der Plasmagewinnung die im Lithium-Heparin-Röhrchen verbliebenen Erythrozyten mit der gleichen Menge steriler NaCl-Lösung, wie Plasma entnommen wurde, verdünnt, und bis zum Ende des Versuches aufbewahrt.

Die Proben wurden bei -80 °C bis zur weiteren Analyse mittels HPLC-Verfahren tiefgefroren.

#### **3.4.2 Bestimmung von Kortisol und Kortikosteron und ihrer Ratio**

##### **3.4.2.1 HPLC-Methodik**

Die Konzentration von Kortisol und Kortikosteron wurde mittels HPLC (Fa. Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) bestimmt. Die Methodik zur Bestimmung der Kortisol- und Kortikosteronkonzentration in den Plasmaproben

wurde modifiziert nach LING und JAMALI (2003) durchgeführt und an die eigenen Gegebenheiten angepasst.

### 3.4.2.2 Extraktion der Proben

Die Vorbereitung der Proben bestand aus mehreren Arbeitsschritten. Zunächst mussten aus dem gewonnenen Plasma die zu untersuchenden Stoffe extrahiert werden. Dies war notwendig, damit nur die zu untersuchenden GK in der Probe verbleiben, da sonst alle im Plasma enthaltenen Proteine die empfindliche chromatographische Säule verstopft hätten. 500 µl Plasma wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. C. Roth GmbH) pipettiert und 50 µl interner Standard (Betamethason 1,25 µg/ml, Fa. Sigma) sowie 5 ml Ethylacetat (Fa. C. Roth GmbH) hinzugefügt. Nach einer ausreichenden Vermischung der Substanzen mittels Vortex<sup>®</sup> Schüttelgerät wurden die Proben für 10 min bei 4 °C und 1800 g zentrifugiert. Nun musste das Extrakt gewaschen werden. Die organische Phase wurde zu 4,9 ml in ein neues 15 ml Zentrifugenröhrchen abpipettiert und 1 ml einer 0,1 molaren Natriumhydroxidlösung (Fa. Merck) dazu gegeben. Es wurde erneut gemischt und für 5 min bei 4 °C und 1800 g zentrifugiert. Nachdem nun 4,5 ml organische Phase abpipettiert wurden, konnte 1 ml destilliertes Wasser (eigene Herstellung) für den zweiten Waschvorgang hinzugefügt werden. Nach erneutem Vermischen und Zentrifugieren für 5 min bei 4 °C und 1800 g, wurde nun 4 ml der organischen Phase in ein 5 ml PP-Röhrchen von oben abgenommen und in einer Vakuumzentrifuge (Modell Speed Vac Concentrator Sc110, Fa. Savant) für insgesamt 40 min verdampft. Zum Lösen der eventuell am oberen Wandbereich verbliebenen Stoffe wurde der Vorgang nach 20 min unterbrochen, um die Röhrchen mittels Vortex<sup>®</sup> zu schütteln. Der Vorgang des Verdampfens wurde dann für weitere 20 min fortgesetzt. Nachdem keine Flüssigkeit mehr in den Röhrchen zu sehen war, wurde nun mit 260 µl mobiler Phase A (1 Liter: 220 ml Acetonitril, Rotisol<sup>®</sup> Fa. C. Roth GmbH; 780 ml HPLC-Wasser, Fa. VWR; 1 ml Essigsäure, Fa. BDH Ltd., UK; 300 µl Triethylamin, Fa. C. Roth GmbH) die zu untersuchenden kristallinen Stoffe wieder in Lösung gebracht. Nach erneutem Vortexen wurden 250 µl in die *Inserts* der *Glasvials* pipettiert und in den Autosampler (System Gold 508, Fa. Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) der HPLC eingesetzt.

### 3.4.2.3 Chromatographische Bedingungen

Es wurden nun die so vorbereiteten Stoffe mit einem Elutionsmittel, den mobilen Phasen A und B (mobile Phase B, 1 Liter: 400 ml Acetonitril Rotisolv<sup>®</sup> Fa. C. Roth GmbH; 600 ml HPLC-Wasser Fa. VWR; 1 ml Essigsäure Fa. BDH Ltd., UK; 300 µl Triethylamin, Fa. C. Roth GmbH) unter Druck durch die stationäre Phase gepumpt. Die Flussgeschwindigkeit betrug hierbei 1,5 ml/min bei einem Injektionsvolumen von 100 µl. Die stationäre Phase bestand dabei aus einer Vorsäule (Security Guard Gemini C 18 4 mm x 3 mm, Fa. Phenomenex) und der eigentlichen Säule (Gemini 5 µm C 18 10 cm, Fa. Phenomenex), die Temperatur des Säulenofens betrug 30 °C. Der definierte Gradient der beiden mobilen Phasen folgte folgendem Protokoll: 00 – 04 min: Phase A 90%, Phase B 10%. 04 – 12 min: Phase B 10-90%. 12 – 15 min: Phase A 90% und Phase B 10%.

Aufgrund der physikalischen und chemikalischen Eigenschaften der Stoffe (Größe, Ladung, Struktur) traten sie unterschiedlich lang mit der stationären Phase in Wechselwirkung. Je stärker diese Wechselwirkung war, desto länger verblieb der Stoff in der Säule, so erschienen die verschiedenen Substanzen zu unterschiedlichen Zeiten am Ende der Trennsäule. Anschließend wurde über einen UV-Detektor (System Gold programmable detector module 166, Fa. Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) das Absorptionsverhalten des Eluates gemessen. Wurde eine Komponente mit eluiert, änderte sich die Absorption. Es wurde UV-Licht (Wellenlänge 254 nm) durch eine vom Eluat (Probe) durchflossene Messzelle geschickt, und anschließend detektiert, wie viel Licht aus dieser Zelle wieder heraus kommt.

Dieses Licht wurde registriert und in ein elektrisches Signal umgewandelt und erschien dann in Form eines Chromatogramms auf dem Bildschirm des an die HPLC angeschlossenen Computers.

#### 3.4.2.4 Berechnung der Glukokortikoidkonzentrationen

Zur manuellen Integration des Chromatogramms wurde das Program 32 Karat™ Software Version 5.0 (Fa. Beckam Coulter, Fullton, CA, USA) verwendet. Für alle weiteren Schritte wurde die Computer Software Microsoft® Excel 2003 (Fa. Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) angewandt.

Anhand von Eichkurven wurde nun die Konzentration der GK unter Einbeziehung des internen Standards berechnet. Anschließend wurde das Verhältnis aus Standard Eichkurve zu Standardprobe ermittelt. Da nach jeder Blutentnahme das VAP-System mit NaCl-Heparinlösung gespült wurde, musste das injizierte Volumen der Spülung von dem Volumen der Blutprobe abgezogen werden. Alle GK-Konzentrationswerte wurden mit dem sog. Verdünnungsfaktor multipliziert. Dieser berechnet sich wie folgt:

Verdünnungsfaktor =  $\text{Volumenprobe}_{\text{gesamt}} / (\text{Volumenprobe}_{\text{gesamt}} - \text{Leervolumen})$ .

Das Leervolumen setzte sich aus der im Katheter vorhandenen Spülflüssigkeit und der in der Portkammer vorhandenen Spülflüssigkeit zusammen,

d.h.:  $\text{Leervolumen} = \text{Volumen im Katheter} + \text{Volumen im Port}$ .

Um die Ratio von Kortisol zu Kortikosteron zu ermitteln, wurden alle Kortisolwerte durch die Kortikosteronwerte geteilt.

## 3.5 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

### 3.5.1 Statistische Analyse der Daten des ACTH-Stimulationstest, des Stressversuchs und des 24 h Profils

Die statistische Auswertung erfolgte deskriptiv mittels der Computer Software Microsoft® Excel 2003 (Fa. Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) sowie schließend mit der Computer Software Sigma Plot® 11.0 (Systat, Erkrath). Die schließende Statistik der Ergebnisse begann mit Test auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov`s Test mit Korrektur nach Lilliefors) und auf Gleichverteilung (Levene`s Median Test), welche automatisch durch das Programm Sigma Plot® 11.0 (Systat, Erkrath) durchgeführt wurden. Erfüllten die Daten beide Kriterien, so wurden parametrische Tests angewendet. Fiel der Test auf Normalverteilung oder Gleichverteilung negativ aus, so wurde der Vergleich zweier Versuchsgruppen mit Hilfe des Mann-Whitney-Rangsummentests durchgeführt. Beim Vergleich mehrerer nicht normal verteilter Gruppen wurde eine rangorientierte Varianzanalyse für wiederholte Messungen nach Friedman (Friedmann RM ANOVA) verwendet.

Zum Vergleich der GK-Konzentrationen der einzelnen Messzeitpunkte im Stresstest, im 24 h Profil, sowie beim ACTH-Stimulationstest als auch zur Auswertung des Hämatokrits wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse für wiederholte Messungen (One Way RM ANOVA) bzw. eine rangorientierte Varianzanalyse für wiederholte Messungen nach Friedman (Friedmann RM ANOVA) durchgeführt. Im Falle einer Signifikanz wurde anschließend ein Student-Newman-Keuls Test (SNK) als post-hoc Test durchgeführt, um tatsächlich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Messzeitpunkten zu identifizieren. Diese Werte werden als arithmetische Mittelwerte gemeinsam mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

Um einen Unterschied zwischen den Geschlechtern identifizieren zu können, wurde beim ACTH-Stimulationstest ein *t*-Test nach Student bzw. ein Rangsummentest nach Mann-Whitney durchgeführt. Um dies auch mit den Werten aus dem Stressversuch und dem 24 h Profil durchführen zu können, wurden Daten ausgewählt, die zwischen 10 Uhr und 12 Uhr in beiden Versuchen



genommen wurden. Aufgrund der großen Variabilität der GK-Konzentrationen wurde versucht Daten auszuwählen, die zu einem ähnlichen Messzeitpunkt erhoben wurden. Dies entsprach bei den männlichen Tieren dem Mittelwert der Messwerte zu den Zeitpunkten  $t = 0$  min (11 Uhr) bis  $t = 45$  min (11:45 Uhr). Bei den weiblichen Tieren war dies durch den Mittelwert der Messwerte zu den Uhrzeiten 10 Uhr und 12 Uhr gegeben. Diese Werte werden als Box Plots (Mediane mit „*Box and Wisker*“, Darstellung der 25/75 % Perzentile (Quartile) und 5/95 % Perzentile) dargestellt.

Die Ergebnisabbildungen wurden mit der Computer-Software Sigma Plot<sup>®</sup> 11.0 (Systat Software GmbH, Erkrath) erstellt. Wahrscheinlichkeitswerte ( $p$ ) kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen und sind entsprechend gekennzeichnet bzw. beschrieben. Die Anzahl der Proben der Versuchstiere wurde mit „ $n$ “ angegeben.

### **3.5.2 Berechnung der z-scores für die Einzeltierdaten des 24 h Profils**

Eine Untersuchung der Daten im 24 h Profil jeder einzelnen Katze wurde durchgeführt, um eventuelle individuelle Hinweise für eine Periodizität im Konzentrationsverlauf der GK und ihrer Ratio zu finden. Mit Hilfe der z-scores war es möglich, die Zeitpunkte zu identifizieren, die sich aus der Verteilung der Tageswerte abheben. Durch das Bestimmen der z-scores werden die einzelnen Tagesprofile der Katzen miteinander vergleichbar, das heißt dass deutliche individuelle Abweichungen über oder unter dem Tagesmittelwert vergleichend bestimmt werden können. Zu einer Serie von Werten kann zu jedem Wert ein z-score berechnet werden. Die Formel zur Berechnung ist:  $(x_i - m)/s$ , wobei  $m$  der Mittelwert und  $s$  die Standardabweichung aller  $x$  ist. Mittelwert und Standardabweichung werden aus den Einzelwerten  $x_1$  bis  $x_n$  berechnet,  $n$  ist die Anzahl der Werte. Es wird vorausgesetzt, dass alle  $x$  aus einer Normalverteilung kommen. Somit repräsentiert der z-score den „Abstand“ eines Wertes  $x_i$  vom Mittelwert, gemessen in Standardabweichungen. Als Abweichungen über oder unter dem Tagesmittelwert wurde ein Wert mit einem z-score über 1,65 oder unter -1,65 ( $|z| \geq 1,65$ ) gewertet. Dies entsprach dem 5 % bzw. 95 % Perzentil der

Normalverteilung. Hat ein Wert einen z-score  $\leq -1,65$  wird er als Minimum bezeichnet. Analog ist ein Wert mit einem z-score  $\geq 1,65$  ein Maximum.

### 3.5.3 Untersuchung auf Peaks für die Einzeltierdaten des 24 h Profils

Die 24 h Profile der Katzen wurde mit Hilfe der Software PeakFit 4.12 (Systat Software GmbH, Erkrath) auf Peaks von Kortisol, Kortikosteron oder der Ratio aus beiden Kortikoiden im tageszeitlichen Verlauf untersucht. Von den in Frage kommenden Peak-Analysefunktionen (Gauss, Poisson, Weibull) wurde die Weibull-Funktion auf Grund ihrer flexiblen Interpuls-Interval-Variabilität ausgewählt, welche am ehesten die Gegebenheiten in neuroendokrinen Systemen abbildet (Veldhuis et al. 2008). Die Dichtefunktion der Weibull-Verteilung ist gegeben durch  $f(x) = \alpha\beta x^{\beta-1} e^{-\alpha x^\beta}$ . Wobei  $\alpha$  und  $\beta$  die Parameter sind, die in der unten beschriebenen Methode angepasst werden,  $e$  ist die Eulersche Zahl.

Zur Analyse wurde die Weibull-Funktion unter statistischer Anwendung einer Residual-Methode herangezogen. Auf Grund der variablen „Startwerte“ (Werte des Beginns des Profils von 12 Uhr) wurde die Einstellung „no baseline“ ausgewählt. Um zu verhindern, dass „Rauschen“ als Peaks erkannt wurden, wurde eine Amplitudenhöhe von 8 % des höchsten Wertes im Profil gefordert. Die Anpassung der berechneten Funktion wurde solange durchgeführt, bis sich keine Änderungen im angegebenen Korrelationskoeffizienten (zwischen berechneter Funktion und gemessenen Werten) mehr ergaben oder wenn mehr als 500 Iterationen durchgeführt wurden. Anhand des berechneten F-Wertes konnte überprüft werden, ob die ermittelten Peakfunktionen signifikant waren.

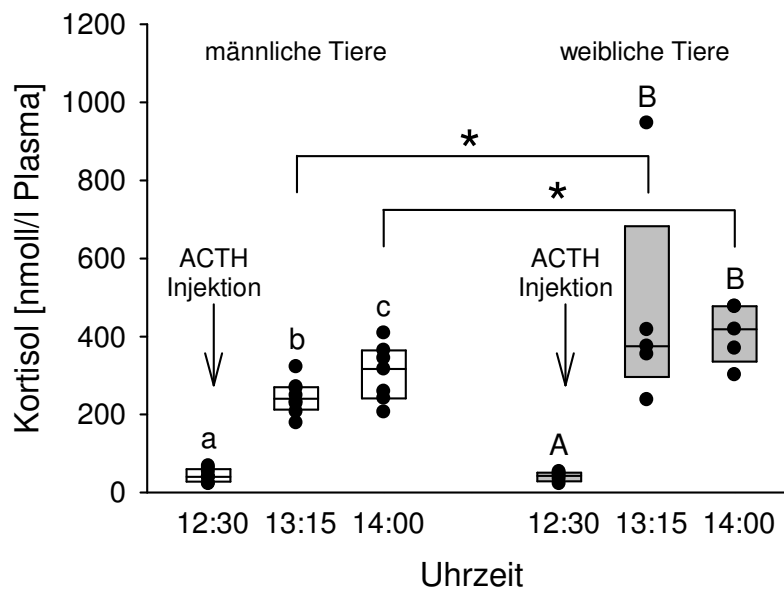
## 4. Ergebnisse

### 4.1 ACTH-Stimulationstest

Der ACTH-Stimulationstest, zur Überprüfung der Nebennieren-Funktion ergab geschlechtsspezifische Unterschiede, so dass die Ergebnisse des Tests ausführlicher dargestellt werden.

Hierfür wurde allen 16 Tieren zu drei verschiedenen Uhrzeiten (12:30 Uhr, 13:15 Uhr und 14:00 Uhr) Blut entnommen. Die Kortisol- und Kortikosteronkonzentration wurde bestimmt, ihre Ratio berechnet und der Hämatokrit wurde gemessen. Aufgrund von zu geringen Probenmengen konnten nach einem zeitweiligen Ausfall der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) die Kortisol- und Kortikosteronwerte der Katzen Nr. 2040, Nr. 6567 und Nr. 6568 nicht in die Untersuchung mit einbezogen werden.

#### 4.1.1 Kortisolkonzentration im Plasma von Katzen vor und nach ACTH-Applikation

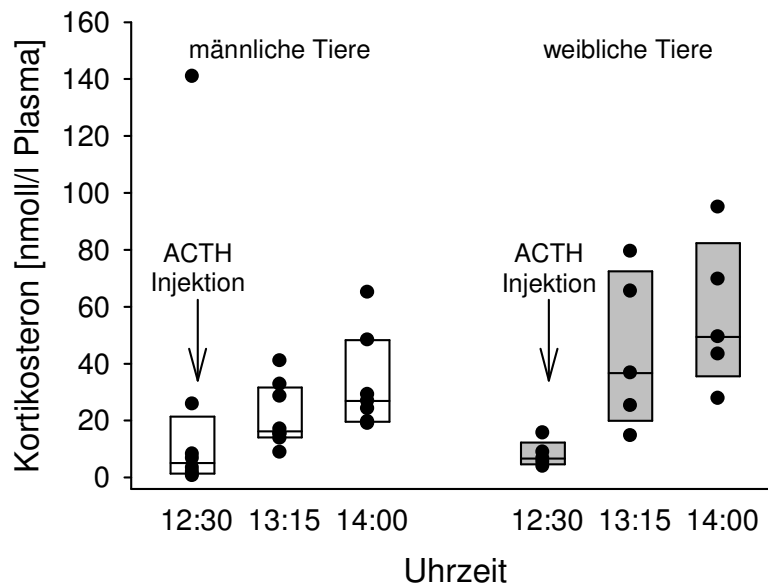


**Abb. 7: Kortisolkonzentration im Plasma von männlichen und weiblichen Tieren vor und nach ACTH-Applikation.** Allen Tieren wurde um 12:30 Uhr Blut abgenommen. Direkt im Anschluss wurden 0,125 mg ACTH i. m. appliziert. Die Kortisolkonzentration wurde im Plasma mittels HPLC bestimmt. Boxplot mit Einzeltierdaten (Punkte).  $n = 8/5$ . a, b, c, A, B: verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede von  $p < 0,05$  (One Way RM ANOVA und SNK). \*: signifikante Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren zum selben Entnahmepunkt ( $p < 0,05$ ;  $t$ -Test).

Bei den männlichen Tieren lag die Kortisolkonzentration im Plasma vor ACTH-Applikation zwischen 22,8 nmol/l und 68,1 nmol/l. Bei den weiblichen Tieren wurden Konzentrationen zwischen 22,7 nmol/l und 53,2 nmol/l bestimmt. Nach ACTH-Injektion kam es bei beiden Geschlechtern zu signifikanten Anstiegen in der Kortisolkonzentration (Abb. 7). Dabei stieg die Konzentration bei den männlichen Tieren zwischen 12:30 und 13:15 Uhr und erneut zwischen 13:15 und 14:00 Uhr an. Bei den weiblichen Tieren blieb ein Anstieg zwischen 13:15 und 14:00 Uhr aus (Abb. 7).

Im Vergleich zwischen den Geschlechtern zeigte sich, dass die weiblichen Tiere nach ACTH-Injektion sowohl um 13:15 Uhr als auch um 14:00 Uhr die höheren Kortisolkonzentrationen im Plasma aufwiesen ( $p < 0,05$ ; Abb. 7).

#### 4.1.2 Kortikosteronkonzentration im Plasma von Katzen vor und nach ACTH-Applikation

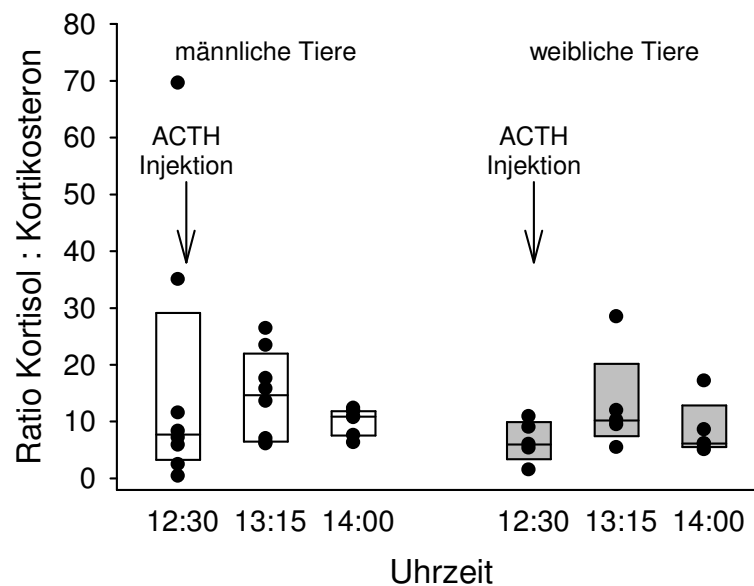


**Abb. 8: Kortikosteronkonzentration im Plasma von männlichen und weiblichen Tieren vor und nach ACTH-Applikation.** Allen Tieren wurde um 12:30 Uhr Blut abgenommen. Direkt im Anschluss wurden 0,125 mg ACTH i. m. appliziert. Die Kortisolkonzentration wurde im Plasma mittels HPLC bestimmt. Boxplot mit Einzeltierdaten (Punkte).  $n = 8/5$ . A, B: verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede von  $p < 0,05$  (One Way RM ANOVA und SNK).

Vor ACTH-Applikation lagen die Kortikosteronkonzentrationen im Plasma bei den Katern zwischen 1,1 nmol/l und 140,9 nmol/l und bei den weiblichen Tieren zwischen 3,9 nmol/l und 15,6 nmol/l. Nach ACTH-Injektion kam es nur bei den weiblichen Tieren zwischen 12:30 und 13:15 Uhr zu einem signifikanten Anstieg in der Kortikosteronkonzentration ( $p < 0,05$ ; Abb. 8). Die männlichen Tiere wiesen eine Tendenz zum Anstieg auf, die jedoch nicht signifikant war, da  $p$  knapp über 0,050 lag ( $p = 0,051$ ; Friedmann RM ANOVA).

Der Vergleich zwischen den Geschlechtern ergab zu keinem Entnahmezeitpunkt einen signifikanten Unterschied in der Kortikosteronkonzentration im Plasma (Abb. 8).

#### 4.1.3 Ratio der Kortisol-/Kortikosteronkonzentration im Plasma von Katzen vor und nach ACTH-Applikation

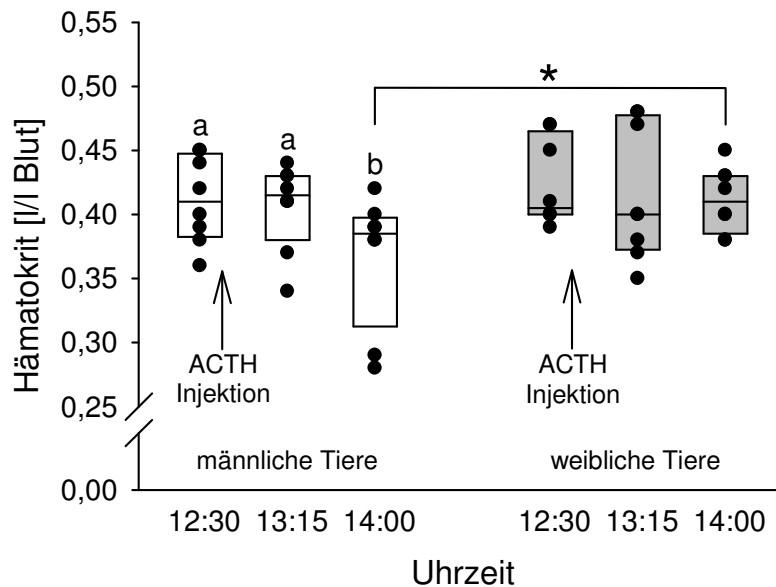


**Abbildung 9: Ratio der Kortisol-/Kortikosteronkonzentration im Plasma von männlichen und weiblichen Tieren vor und nach ACTH-Applikation.** Allen Tieren wurde um 12:30 Uhr Blut abgenommen. Direkt im Anschluss wurden 0,125 mg ACTH i. m. appliziert. Die Ratio wurde aus den Kortisol- und Kortikosteronkonzentrationen berechnet. Diese wurden mittels HPLC bestimmt. Boxplot mit Einzeltierdaten (Punkte). n = 8/5.

In der Ratio zeigten die Ausgangswerte (12:30 Uhr) der männlichen Tiere eine größere Streuung (0,4 bis 69,5) als die der weiblichen Tiere (1,5 bis 10,9). Es ergaben sich im Verlauf des ACTH-Stimulationstestes keine Änderungen in der Ratio, weder bei den männlichen noch bei den weiblichen Tieren. Die weiblichen Tiere allerdings tendierten zum Unterschied der drei Werte, der sich aber als nicht signifikant erwies ( $p = 0,053$ ; Abb. 9).

Der Vergleich zwischen den Geschlechtern ergab keine Unterschiede in der Ratio zu den drei Messzeitpunkten (Abb. 9).

#### 4.1.4 Hämatokritwerte von Katzen vor und nach ACTH-Applikation



**Abb. 10: Hämatokritwerte von männlichen und weiblichen Tieren vor und nach ACTH Applikation.** Allen Tieren wurde um 12:30 Uhr Blut abgenommen. Direkt im Anschluss wurden 0,125 mg ACTH i. m. appliziert. Der Hämatokrit wurde anschließend mittels Mikrohämatokritmethode bestimmt. Boxplot mit Einzeltierdaten (Punkte).  $n = 8/8$ . a, b: verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede von  $p < 0,05$  (One Way RM ANOVA und SNK). \*: signifikante Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren zum selben Entnahmezeitpunkt ( $p < 0,05$ ;  $t$ -Test).

Vor ACTH-Injektion (12:30 Uhr) lag der Hämatokritwert der männlichen Tiere bei  $0,41 \pm 0,01$  l/l Blut. Die weiblichen Tiere hatten um 12:30 Uhr einen geringfügig höheren Wert von  $0,42 \pm 0,01$  l/l Blut. Bei den männlichen Tieren zeigte sich zwischen 13:15 und 14:00 Uhr eine Abnahme der Hämatokritwerte ( $p < 0,05$ ), während der Verlauf der Hämatokritwerte der weiblichen Tiere unverändert blieb (Abb. 10).

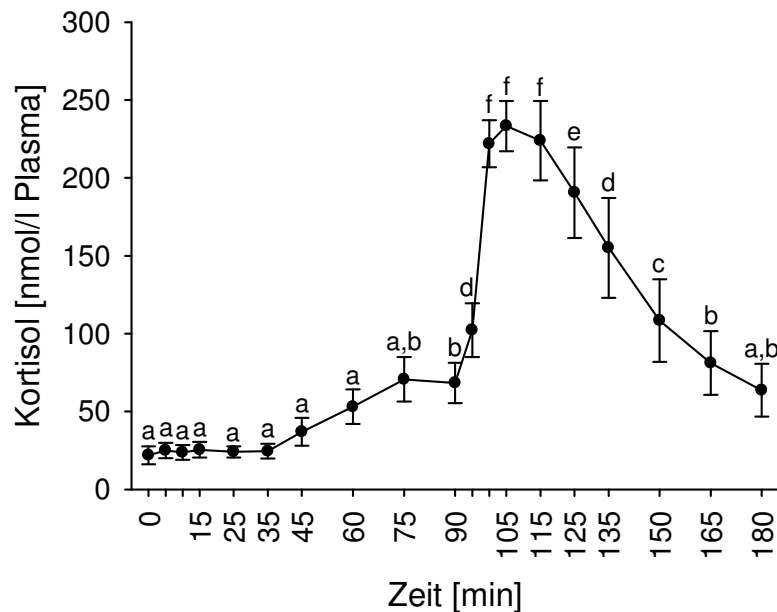
Beim Vergleich zwischen den Geschlechtern zeigte sich, dass die weiblichen Tiere um 14:00 Uhr die höheren Hämatokritwerte im Blut aufwiesen ( $p < 0,05$ ; Abb. 10).

## 4.2 Stresstest

Im Rahmen eines Stresstests wurde acht Katzen 19-mal in unterschiedlichen Zeitintervallen (5 min, 10 min, 15 min) in einem Zeitraum von 3 h Blut entnommen. Dies geschah durch das total implantierte Portkathetersystem (venous access port(VAP)-System). Ein milder Stressor in Form einer dreiminütigen Dusche mit handwarmen Wasser wurde zum Zeitpunkt  $t = 90$  min angewendet. Der zeitliche Ablauf des Versuches wurde so gewählt, dass der milde Stressor „Dusche“ zur selben Zeit angewendet wurde, wie die ACTH-Injektion zur Überprüfung der NN-Funktion. Die Plasmakonzentration von Kortisol und Kortikosteron wurde ermittelt, ihre Ratio berechnet und der Hämatokrit gemessen. Die aufgrund von zu geringer Probenmenge fehlenden Daten wurden bei den Katzen Nr. 6566 ( $t = 105$  min) und Nr. 6564 ( $t = 180$  min) interpoliert bzw. extrapoliert.



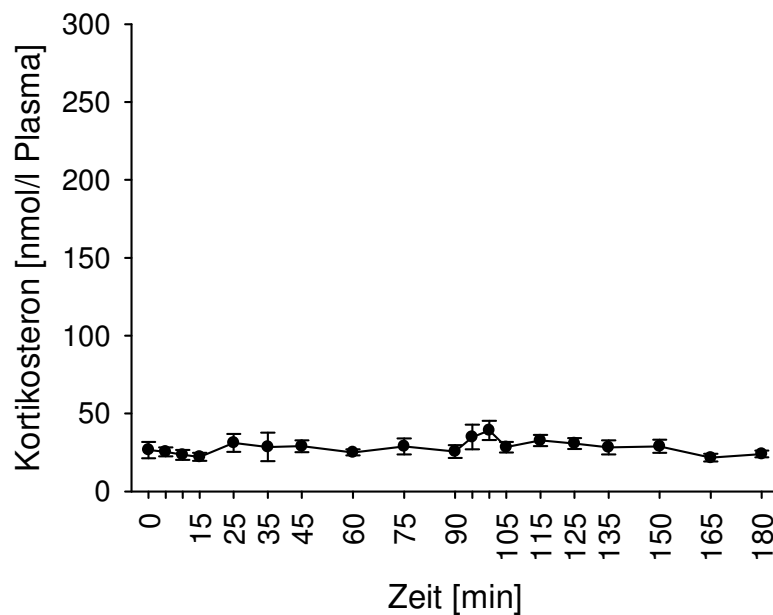
#### 4.2.1 Kortisolkonzentration im Plasma bei Katern vor und nach Einwirkung eines milden Stressors.



**Abb. 11: Kortisolkonzentration im Plasma von Katern während der Einwirkung eines milden Stressors.** Das Blut wurde über das VAP-System entnommen und im Plasma die Kortisolkonzentration bestimmt (HPLC). Nach 90 min wurden die Kater in einen Käfig verbracht und 3 min mit ca. 23 °C warmem Wasser geduscht. Mittelwerte  $\pm$  SEM. n = 8. a - f: verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede an ( $p < 0,05$ ; One Way RM ANOVA und SNK).

Die Kortisolkonzentration blieb zu Beginn des Versuches nahezu gleich und unterschied sich in den ersten 75 min nicht. Direkt vor der Dusche ( $t = 90$  min) lag die Konzentration allerdings signifikant höher als zwischen 0 und 60 min (Abb. 11). Nach der Dusche stieg die Kortisolkonzentration bis zur 100. min an und verbleib auf diesem Niveau bis zu 115. min. Danach sank die Konzentration kontinuierlich bis zur 165. min. Die Kortisolkonzentration am Ende des Versuchs ( $t = 180$  min) unterschied sich nicht mehr von der Konzentration vor Einwirkung des Stressors (Abb. 11).

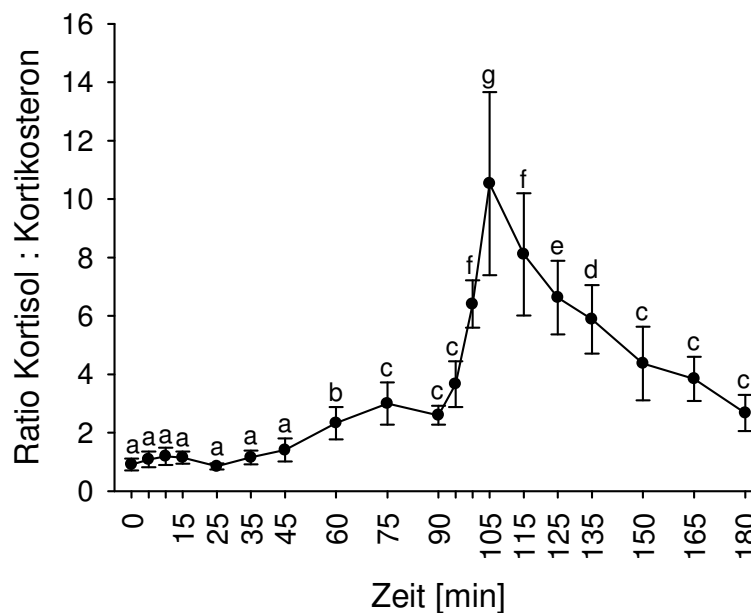
#### 4.2.2 Kortikosteronkonzentration im Plasma bei Katern vor und nach Einwirkung eines milden Stressors



**Abb. 12: Kortikosteronkonzentration im Plasma von Katern während der Einwirkung eines milden Stressors.** Das Blut wurde über das VAP-System entnommen und im Plasma die Kortikosteronkonzentration bestimmt (HPLC). Nach 90 min wurden die Kater in einen Käfig verbracht und 3 min mit ca. 23 °C warmem Wasser geduscht. Mittelwerte  $\pm$  SEM. n = 8.

Die Kortikosteronkonzentration blieb nahezu auf gleichem Niveau und unterschied sich zu keinem Zeitpunkt des Versuches. Nach Einwirkung des milden Stressors deutet sich ein geringgradiger Anstieg an, der jedoch nicht signifikant war (Abb. 12).

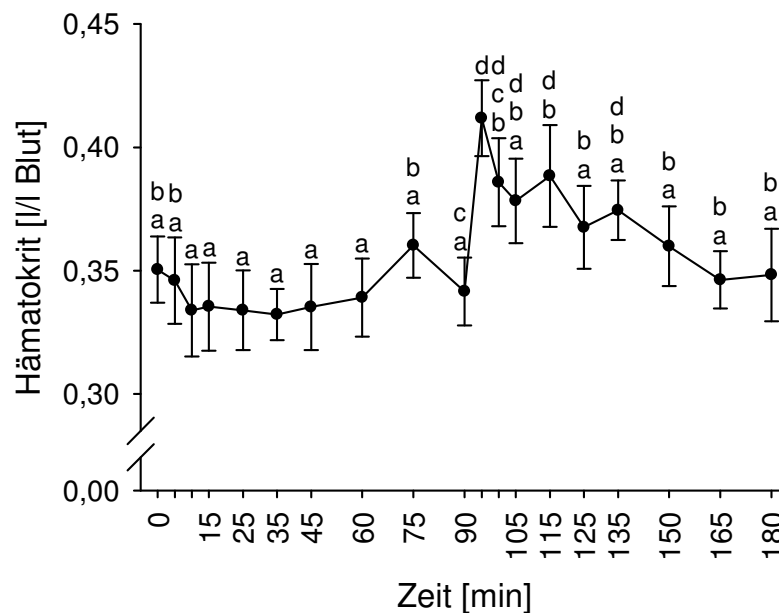
#### 4.2.3 Ratio der Kortisol-/Kortikosteronkonzentration im Plasma bei Katern vor und nach Einwirkung eines milden Stressors



**Abb. 13: Ratio der Kortisol-/Kortikosteronkonzentration im Plasma von Katern während der Einwirkung eines milden Stressors.** Das Blut wurde über das VAP-System entnommen und im Plasma die Kortisol- und Kortikosteronkonzentration bestimmt (HPLC). Anschließend wurde die Ratio berechnet. Nach 90 min wurden die Kater in einen Käfig verbracht und 3 min mit ca. 23 °C warmem Wasser geduscht. Mittelwerte  $\pm$  SEM. n = 8. a - g: verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede an ( $p < 0,05$ ; One Way RM ANOVA und SNK).

Die Ratio aus Kortisol und Kortikosteron war konstant zwischen 0 und 45 min, darauf folgte ein kontinuierlicher Anstieg bis zur 75. min. Die Ratio veränderte sich zwischen 75 und 90 min nicht und stieg auch direkt nach dem Stressor ( $t = 95$  min) nicht an. Dann aber kam es erneut zu einem kontinuierlichen Anstieg bis zur 105. min. Anschließend folgte ein sofortiger kontinuierlicher Abfall bis zur 150. min. Die Ratio unterschied sich bei  $t = 180$  min nicht zu  $t = 90$  min, erwies sich aber als signifikant höher als zwischen 0 und 60 min ( $p < 0,05$ ; Abb. 13).

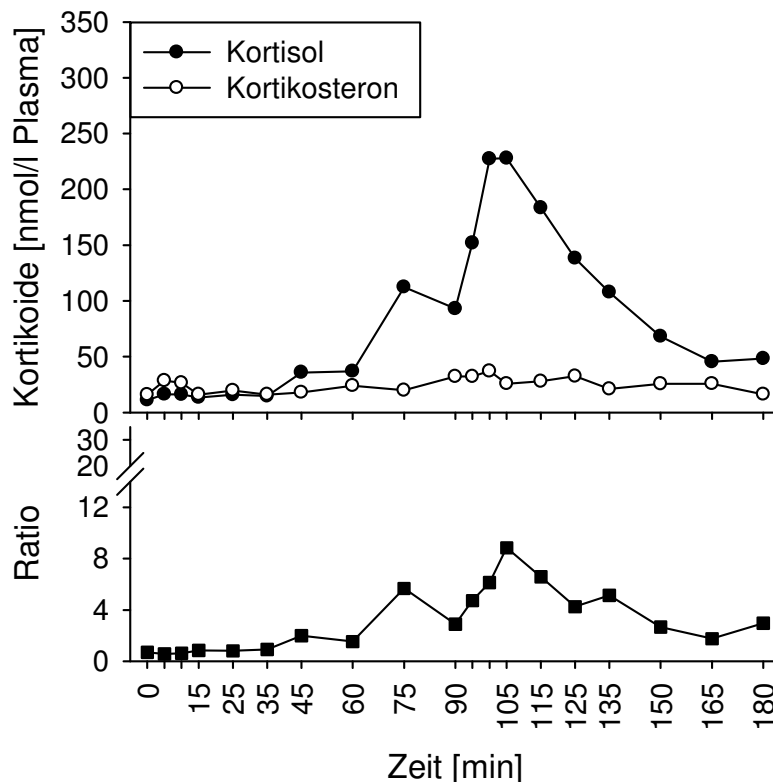
#### 4.2.4 Hämatokritwerte bei Katern vor und nach der Einwirkung eines milden Stressors



**Abb. 14: Hämatokritwerte von Katern während der Einwirkung eines milden Stressors.** Das Blut wurde über das VAP-System entnommen. Der Hämatokrit wurde anschließend mittels Mikrohämatokritmethode bestimmt. Nach 90 min wurden die Kater in einen Käfig verbracht und 3 min mit ca. 23 °C warmem Wasser geduscht. Mittelwerte  $\pm$  SEM.  $n = 8$ . a - d: verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede an ( $p < 0,05$ ; One Way RM ANOVA und SNK).

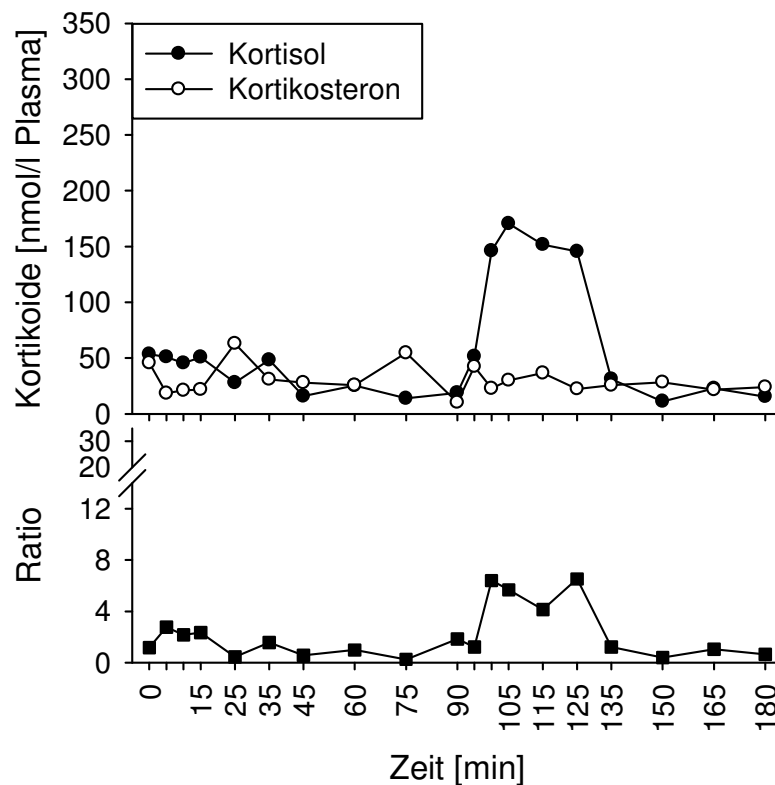
Der Hämatokrit variierte vor Einwirkung des milden Stressors zwischen  $0,33 \pm 0,01$  l/l Blut und  $0,36 \pm 0,01$  l/l Blut und unterschied sich dabei zu keinem Zeitpunkt. Zum Zeitpunkt  $t = 95$  min kam es zu einem Anstieg auf eine im Versuch maximale Konzentration von  $0,41 \pm 0,02$  l/l Blut ( $p < 0,05$ ; Abb. 14). Schon ab der 100. min fiel der Hämatokrit abrupt wieder, dies war aber nicht signifikant. Ab dem Zeitpunkt  $t = 125$  min unterschieden sich die Hämatokritwerte dauerhaft nicht mehr von den Werten vor Einwirkung des milden Stressors ( $t = 0$  bis  $t = 90$  min; Abb. 14).

#### 4.2.5 Darstellung der Glukokortikoide und ihrer Ratio der einzelnen Kater vor und nach Einwirkung eines milden Stressors



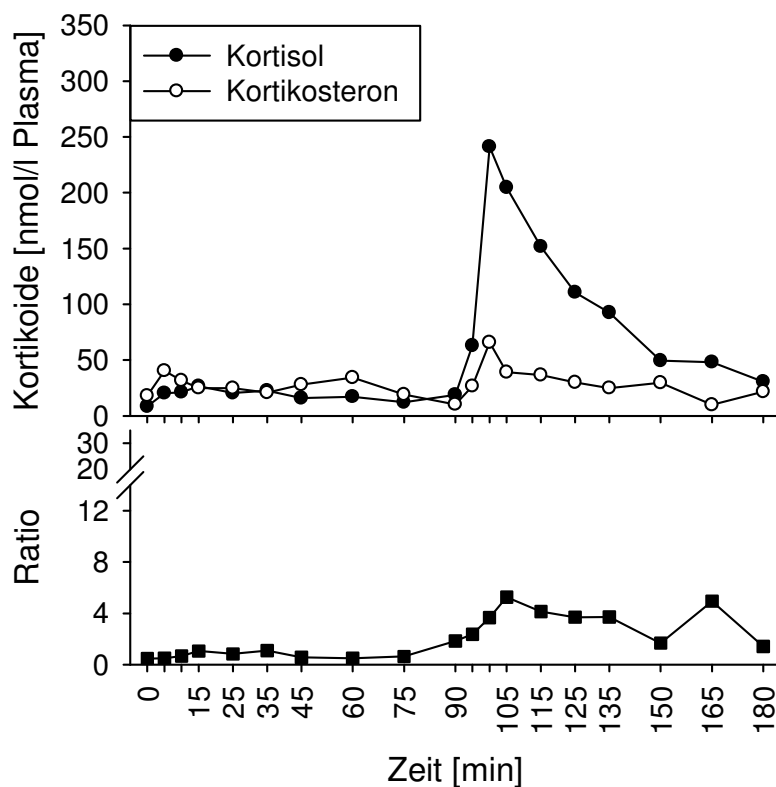
**Abb. 15: Glukokortikoide und ihre Ratio des Katers Nr. 2120 während der Einwirkung eines milden Stressors.** Das Blut wurde über das VAP-System entnommen und im Plasma die Kortisolkonzentration bestimmt (HPLC). Anschließend wurde die Ratio berechnet. Nach 90 min wurde der Kater in einen Käfig verbracht und 3 min mit ca. 23 °C warmem Wasser geduscht.

Die Kortisolkonzentration im Plasma des Katers Nr. 2120 erreichte nach 105 min ein Maximum von 227,9 nmol/l, Ein kontinuierlicher Anstieg nach der Dusche war bei diesem Tier zu erkennen, ebenso fiel die Kurve kontinuierlich wieder ab. Ein Anstieg vor dem milden Stressor war ebenfalls zu sehen (t = 60 min bis t = 90 min; Abb. 15). Die Kortikosteronkonzentration erreichte ihr Maximum zum Zeitpunkt t = 100 min mit einem Wert von 37,1 nmol/l. Sie verhielt sich gegenüber der Kortisolkonzentration ähnlich, auch hier ist ein stressassoziiertes, wenn auch geringgradiger, Anstieg zu erkennen (Abb. 15). Die Ratio ähnelte stark der Kortisolkurve, da die Kortikosteronkurve sich wenig veränderte und der Kortisolkurve glich (Abb. 15).



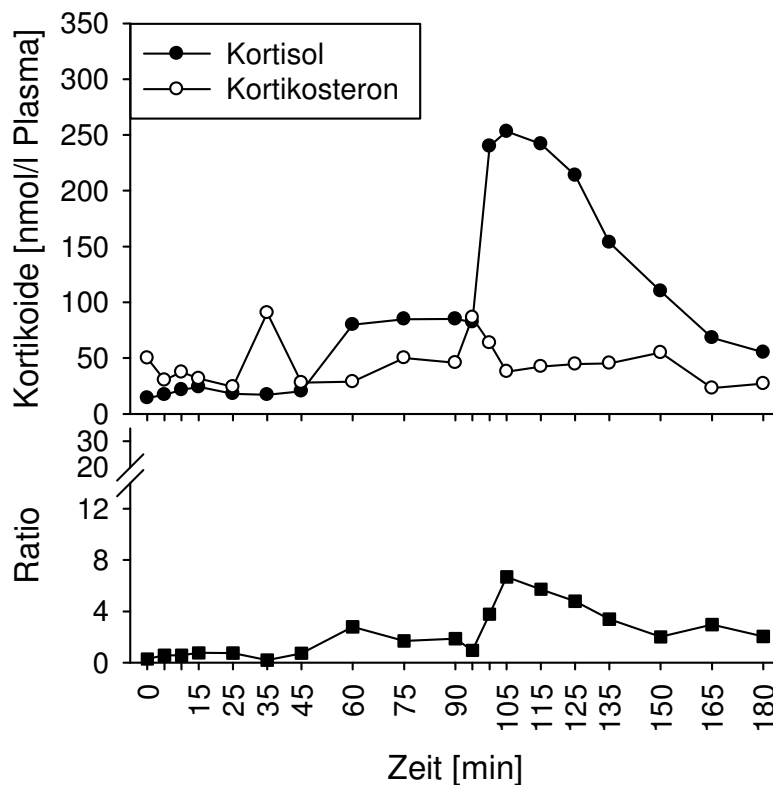
**Abb. 16: Glukokortikoide und ihre Ratio des Katers Nr. 2125 während der Einwirkung eines milden Stressors.** Das Blut wurde über das VAP-System entnommen und im Plasma die Kortisolkonzentration bestimmt (HPLC). Anschließend wurde die Ratio berechnet. Nach 90 min wurde der Kater in einen Käfig verbracht und 3 min mit ca. 23 °C warmem Wasser geduscht.

Die Kortisolkonzentration von Kater Nr. 2125 erreichte ihren maximalen Wert von 170,5 nmol zur 105. min. Der Kurvenverlauf zeigte ebenfalls einen Anstieg nach dem milden Stressor, der aber auf einem Plateau verweilte und nach 125 min schnell und kontinuierlich abfiel. Ein Anstieg vor der Dusche war nicht zu beobachten (Abb. 16). Die Kortikosteronkonzentration verhielt sich nicht wie die Kortisolkonzentration, ihr maximaler Wert lag vor Einwirkung des milden Stressors ( $t = 35$  min) bei 63,0 nmol/l. Sie zeigte zudem nur einen kurzen geringgradigen Anstieg und Abfall ( $t = 90$  bis  $t = 100$  min; Abb. 16). Der Hauptpeak der Ratio nach Einwirkung des milden Stressors wurde aufgrund der Kurvenverläufe von Kortisol und Kortikosteron bei  $t = 115$  min zweigeteilt.



**Abb. 17: Glukokortikoide und ihre Ratio des Katers Nr. 2127 während der Einwirkung eines milden Stressors.** Das Blut wurde über das VAP-System entnommen und im Plasma die Kortisolkonzentration bestimmt (HPLC). Anschließend wurde die Ratio berechnet. Nach 90 min wurde der Kater in einen Käfig verbracht und 3 min mit ca. 23 °C warmem Wasser geduscht.

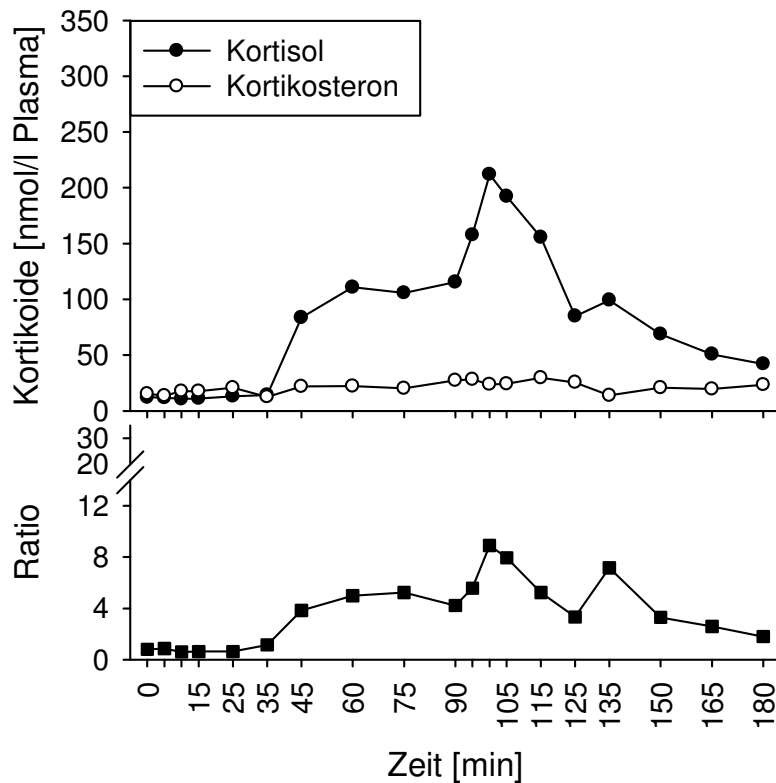
Die maximale Konzentration von Kortisol des Katers Nr. 2127 betrug nach 100 min 241,1 nmol/l. Der Kurvenverlauf erwies einen steilen schnellen Anstieg, der in einem kontinuierlichen Abfall der Konzentration überging. Ein Anstieg vor der Dusche war nicht zu beobachten (Abb. 17). Die Kortikosteronkonzentration verlief parallel zur Kortisolkonzentration und zeigte einen schnellen Anstieg und Abfall. Die maximale Kortikosteronkonzentration lag zum gleichen Zeitpunkt wie Kortisol bei 65,7 nmol/l. Somit kam es bei der Ratio zu einer geringeren Peakbildung nach der Dusche als bei den anderen Katern (Abb. 17).



**Abb. 18: Glukokortikoide und ihre Ratio des Katers Nr. 2128 während der Einwirkung eines milden Stressors.** Das Blut wurde über das VAP-System entnommen und im Plasma die Kortisolkonzentration bestimmt (HPLC). Anschließend wurde die Ratio berechnet. Nach 90 min wurde der Kater in einen Käfig verbracht und 3 min mit ca. 23 °C warmem Wasser geduscht.

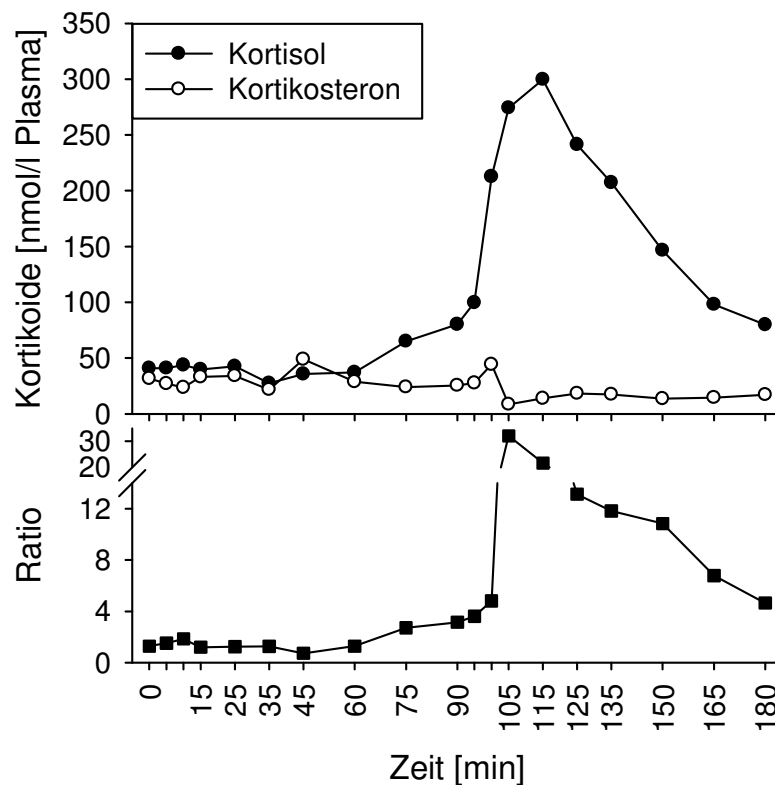
Der Verlauf der Kortisolkonzentration zeigte bei dem Kater Nr. 2128 einen maximalen Wert von 253,1 nmol/l nach 105 min. Nach einem steilen Anstieg verweilte die Konzentration des Kortisols auf einem Plateau (t = 100 bis t = 115 min) bis sie zum Zeitpunkt t = 180 min kontinuierlich abfiel. Dieser Kater wies eine deutliche Reaktion in der Kortisolkonzentration vor der Einwirkung des milden Stressors mit einem Anstieg ab der 45. min und einem Plateau bis zu einem weiteren stressassoziierten Anstieg auf (t = 95 min; Abb. 18). Die Kortikosteronkonzentration verhielt sich gegenläufig. Sie zeigte nur einen kurzen Anstieg nach der Dusche mit gleich darauf folgendem Abfall. Die maximale Konzentration lag bei 86,4 nmol/l zur 95. min (Abb. 18). Der Verlauf der Ratio ähnelte dem der Kortisolkonzentration mit einem Anstieg vor dem milden Stressor und einem weiteren nach der Dusche (Abb. 18).





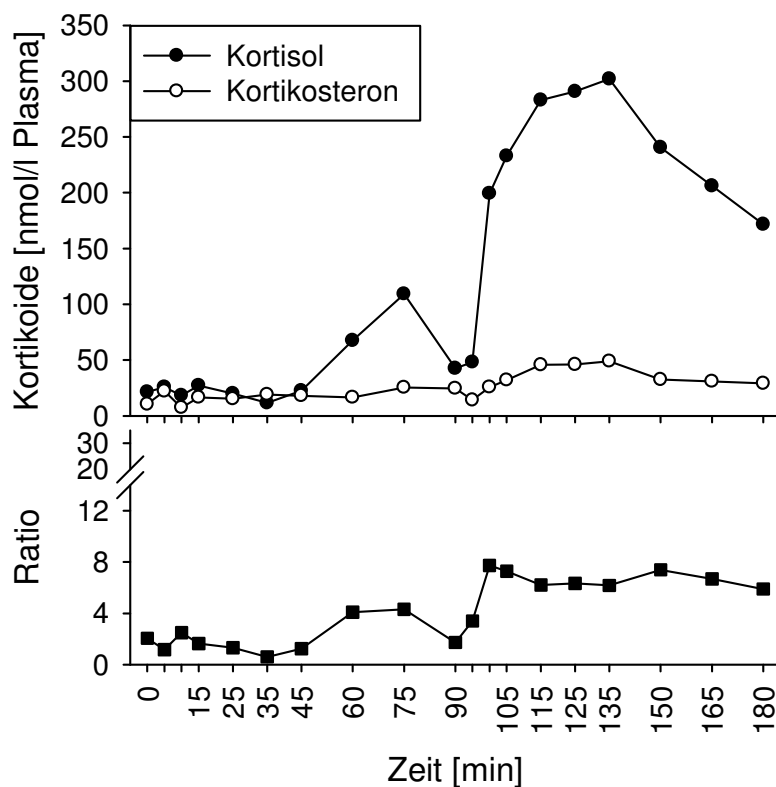
**Abb. 19: Glukokortikoide und ihre Ratio des Katers Nr. 6559 während der Einwirkung eines milden Stressors.** Das Blut wurde über das VAP-System entnommen und im Plasma die Kortisolkonzentration bestimmt (HPLC). Anschließend wurde die Ratio berechnet. Nach 90 min wurde der Kater in einen Käfig verbracht und 3 min mit ca. 23 °C warmem Wasser geduscht.

Die maximale Konzentration von Kortisol war bei Kater Nr. 6559 nach 100 min mit einem Wert von 211,9 nmol/l erreicht. Nach einem eindeutigen Anstieg vor dem Stressor ab der 35. min, kam es dann zu einem kontinuierlichen Anstieg bis zur 100. min. Anschließend fiel die Konzentration wieder ab (Abb. 19). Die Kortikosteronkonzentration erreichte zwar in der 115. min ihren höchsten Wert von 29,7 nmol/l, zeigte aber im Verlauf keine Reaktion auf die Dusche. Deswegen ähnelte die Ratio stark der Kortisolkurve (Abb. 19).



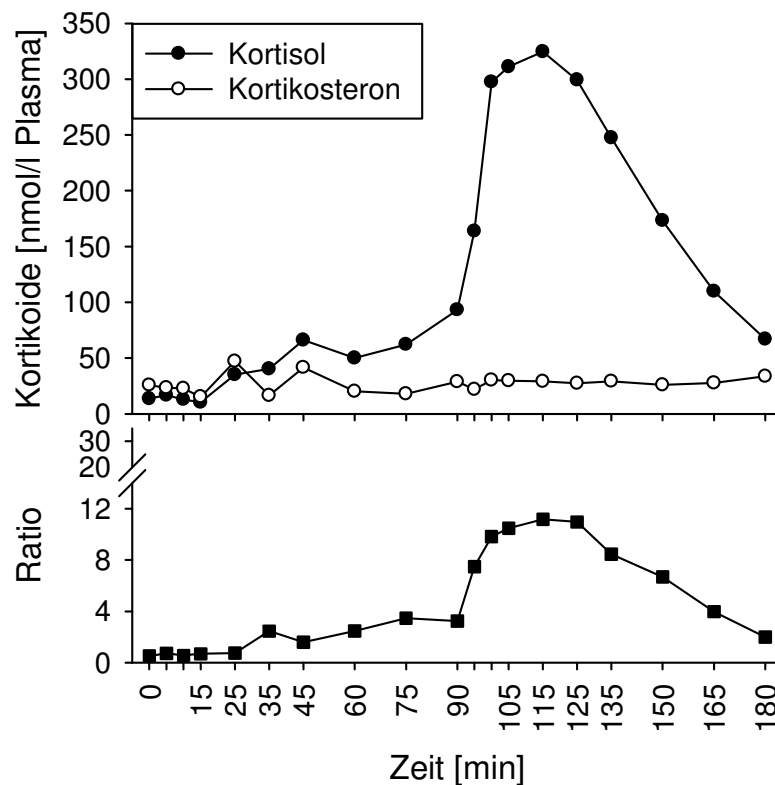
**Abb. 20: Glukokortikoide und ihre Ratio des Katers Nr. 6563 während der Einwirkung eines milden Stressors.** Das Blut wurde über das VAP-System entnommen und im Plasma die Kortisolkonzentration bestimmt (HPLC). Anschließend wurde die Ratio berechnet. Nach 90 min wurde der Kater in einen Käfig verbracht und 3 min mit ca. 23 °C warmem Wasser geduscht.

Der Kurvenverlauf der Kortisolkonzentration von Kater Nr. 6563 gipfelte in der 115. min mit 299,7 nmol/l. Er stieg nach der Dusche steil und kontinuierlich an und fiel ebenso ab. Dabei ließ sich ein geringgradiger Anstieg vor dem milden Stressor nach der 60. min erkennen (Abb. 20). Kortikosteron verhielt sich in seinem Konzentrationsverlauf gegensätzlich zur Kortisolkonzentration. Der Verlauf zeigt einen kleinen Peak in der 100. min, wobei die maximale Konzentration von 48,9 nmol/l vor dem Einwirken des milden Stressors zu finden ist ( $t = 45$  min; Abb. 20). Durch nur geringe Konzentrationsänderungen des Kortikosterons ähnelte der Verlauf der Ratio dem des Kortisols (Abb. 20).



**Abb. 21: Glukokortikoide und ihre Ratio des Katers Nr. 6564 während der Einwirkung eines milden Stressors.** Das Blut wurde über das VAP-System entnommen und im Plasma die Kortisolkonzentration bestimmt (HPLC). Anschließend wurde die Ratio berechnet. Nach 90 min wurde der Kater in einen Käfig verbracht und 3 min mit ca. 23 °C warmem Wasser geduscht.

Die maximale Kortisolkonzentration betrug bei dem Kater Nr. 6564 nach 135 min 301,9 nmol/l. Der schnelle, steile Anstieg nach der Dusche geht anschließend in ein Plateau über ( $t = 115$  bis  $t = 135$  min). Auch bei diesem Kater gab es eine Reaktion der Kortisolkonzentration vor dem milden Stressor ( $t = 45$  min bis  $t = 90$  min; Abb. 21). Der Verlauf der Kortikosteronkonzentration ähnelte dem der Kortisolkonzentration, wobei die maximale Konzentration von 49,0 nmol/l auch bei 135 min lag (Abb. 21). Die Ratio beider GK spiegelt den Anstieg der Kortisolkonzentration vor dem milden Stressor wieder (Abb. 21). Aufgrund des gleichartigen Verlaufs der GK nach dem milden Stressor verblieb die Ratio zwischen der 100. und 180. min fast konstant auf erhöhtem Niveau (Abb. 21).



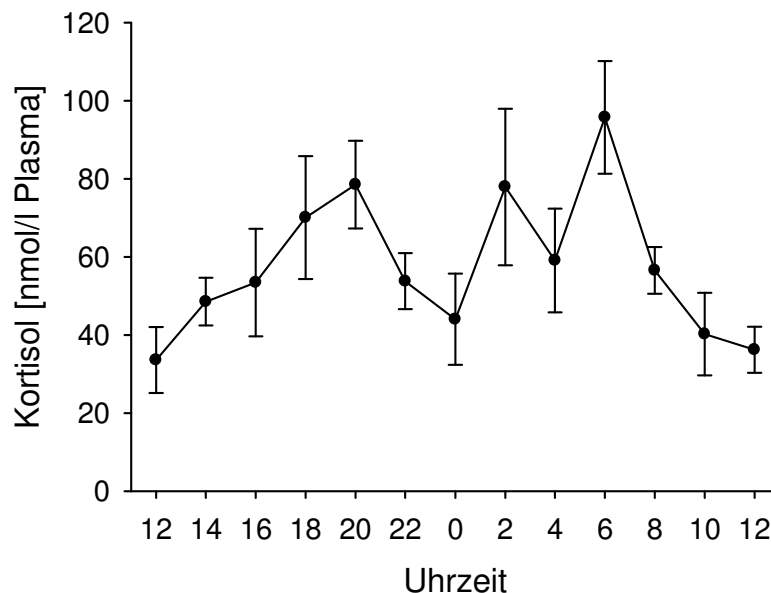
**Abb. 22: Glukokortikoide und ihre Ratio des Katers Nr. 6566 während der Einwirkung eines milden Stressors.** Das Blut wurde über das VAP-System entnommen und im Plasma die Kortisolkonzentration bestimmt (HPLC). Anschließend wurde die Ratio berechnet. Nach 90 min wurde der Kater in einen Käfig verbracht und 3 min mit ca. 23 °C warmem Wasser geduscht.

Die maximale Konzentration des Kortisols lag bei Kater Nr. 6566 nach 115 min bei 324,6 nmol/l. Dies war die maximale Kortisolkonzentration unter allen Tieren des Stressversuchs. Nach der Dusche stieg die Konzentration steil an und bildete ein Plateau zwischen der 100. und 125. min. Ein Anstieg vor dem Einwirken des milden Stressors war zu erkennen, beginnend nach 15 min. Dieser war jedoch nicht so ausgeprägt wie bei anderen Tieren (Abb. 22). Die Kortikosteronkonzentration reagierte gar nicht auf den milden Stressor und hatte ihren maximalen Wert von 47,2 nmol/l schon nach 25 min (Abb. 22). Somit ähnelte der Verlauf der Ratio wieder stark dem der Kortisolkonzentration (Abb. 22).

### 4.3 24 h Profil

Zur Untersuchung der GK-Sekretion des 24 h Profils wurde acht weiblichen Tieren 13-mal Blut in Zeitabständen von 2 h innerhalb von 24 h abgenommen. Die Konzentrationen von Kortisol und Kortikosteron wurden bestimmt, ihre Ratio berechnet und der Hämatokritwert wurde gemessen. Die erste 12-Uhr-Messung wird mit 12(1) Uhr angegeben.

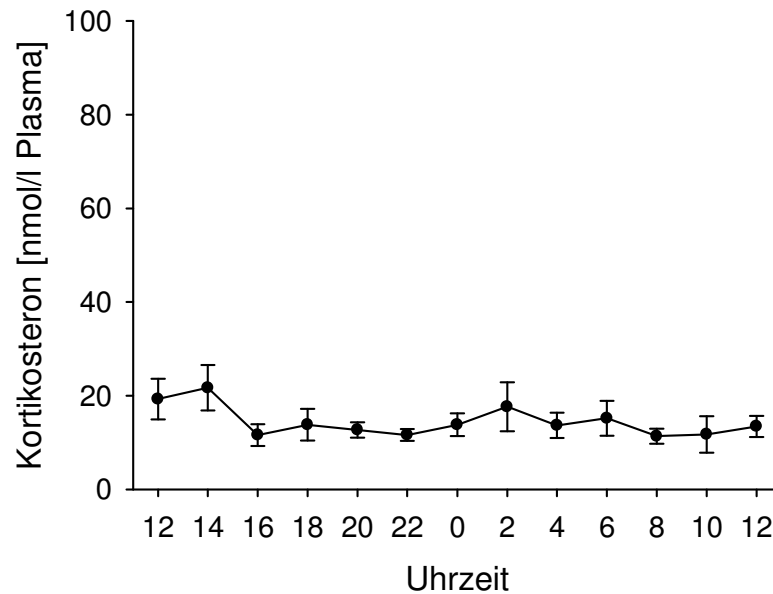
#### 4.3.1 24 h Profil der Kortisolkonzentration im Plasma weiblicher Katzen



**Abb. 23: Kortisolkonzentration im Plasma von weiblichen Katzen während des 24 h Profils.** Das Blut wurde über das VAP-System entnommen und die Kortisolkonzentration wurde im Plasma bestimmt (HPLC). Mittelwerte  $\pm$  SEM.  $n = 8$ .

Die Kortisolkonzentrationen unterschieden sich zwar signifikant (One Way RM ANOVA,  $p < 0,05$ ). Dieser Unterschied war jedoch so gering, dass im posthoc-Test (SNK) keine signifikant unterschiedlichen Messzeitpunkte gefunden werden konnten (Abb. 23). Dabei lag die höchste Kortisolkonzentration von  $95,8 \pm 14,4$  nmol/l um 6 Uhr und die niedrigste Konzentration bei  $33,6 \pm 8,4$  nmol/l um 12(1) Uhr.

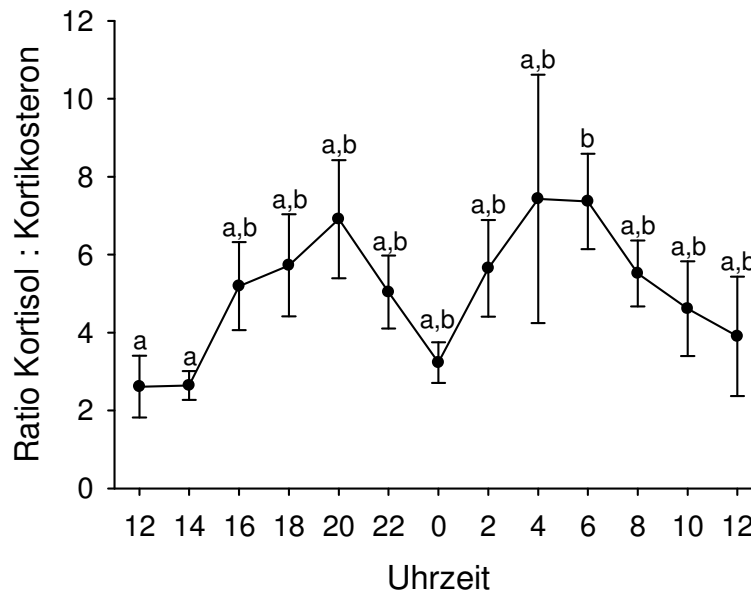
#### 4.3.2 24 h Profil der Kortikosteronkonzentration im Plasma weiblicher Katzen



**Abb. 24: Kortikosteronkonzentration im Plasma von weiblichen Katzen während des 24 h Profils.** Das Blut wurde über das VAP-System entnommen und die Kortikosteronkonzentration wurde im Plasma bestimmt (HPLC). Mittelwerte  $\pm$  SEM.  $n = 8$ .

Die Kortikosteronkonzentration im Plasma der weiblichen Katzen lag zwischen  $11,4 \pm 1,6$  nmol/l und  $21,7 \pm 4,9$  nmol/l. Dabei unterschied sich die Konzentration zu keinem Zeitpunkt während der 24 h (Abb. 24).

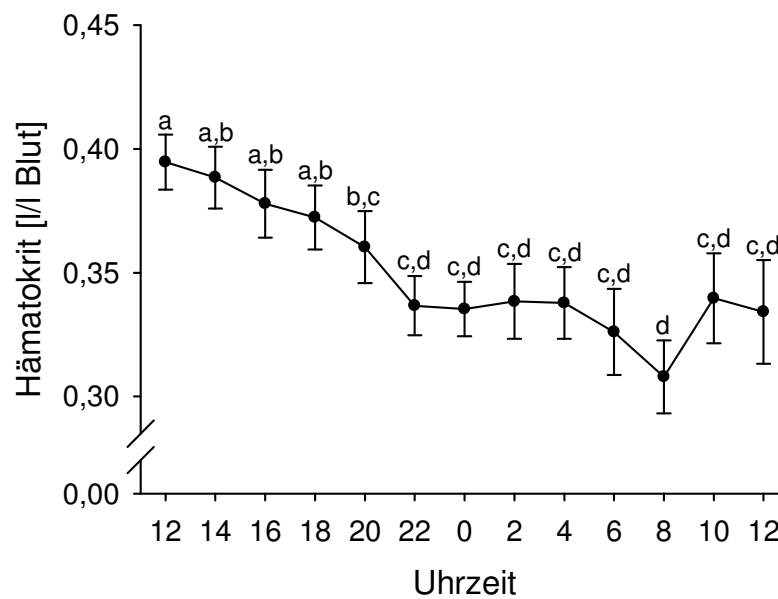
#### 4.3.3 24 h Profil der Ratio der Kortisol-/Kortikosteronkonzentration im Plasma weiblicher Katzen



**Abb. 25: Ratio der Kortisol-/Kortikosteronkonzentration im Plasma von weiblichen Katzen während des 24 h Profils.** Das Blut wurde über das VAP-System entnommen und die Kortisol- und Kortikosteronkonzentration wurde im Plasma bestimmt (HPLC). Anschließend wurde die Ratio berechnet. Mittelwerte  $\pm$  SEM.  $n = 8$ . a, b: verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede an ( $p < 0,05$ ; One Way RM ANOVA und SNK).

Der Verlauf der Ratio aus der Kortisol- und Kortikosteronkonzentration ähnelte dem der Kortisolkonzentration. Im Gegensatz zur Kortisolkonzentration konnten zwischen dem 6-Uhr-Wert und dem ersten 12-Uhr-Wert sowie dem 14-Uhr-Wert signifikante Unterschiede festgestellt werden (Abb. 25).

#### 4.3.4 24 h Profil der Hämatokritwerte der weiblichen Katzen



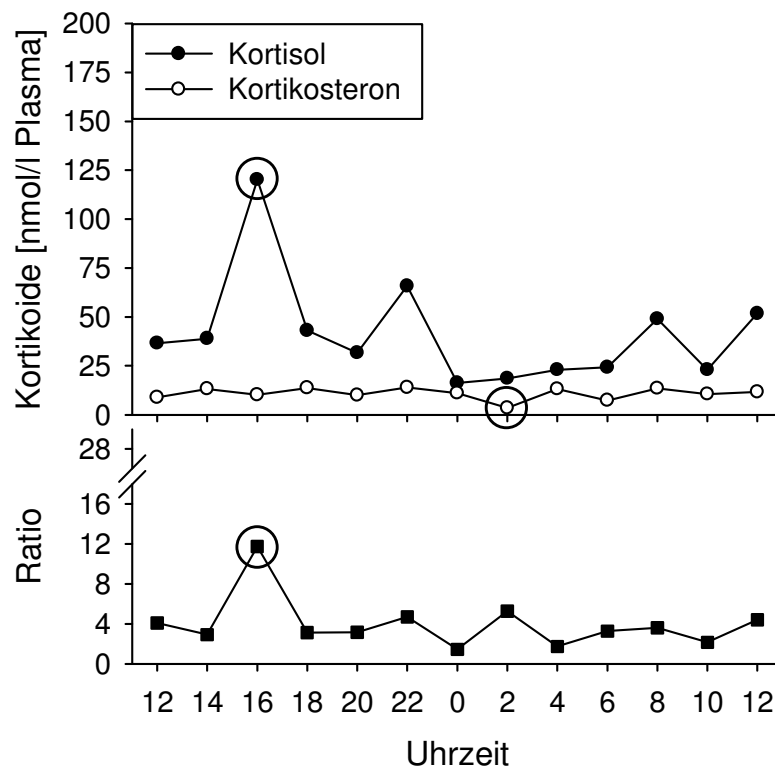
**Abbildung 26: Hämatokritwerte der weiblicher Katzen während des 24 h Profils.** Das Blut wurde über das VAP-System entnommen und der Hämatokrit mittels Mikrohämatokritmethode bestimmt. Mittelwerte  $\pm$  SEM.  $n = 8$ . a - d: verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede an ( $p < 0,05$ ; One Way RM ANOVA und SNK).

Die Hämatokritwerte schwankten im Verlauf der 24 h zwischen  $0,33 \pm 0,02$  l/l Blut und  $0,39 \pm 0,01$  l/l Blut (Abb. 26). Die Hämatokritwerte zwischen 22 Uhr und 12 Uhr am nächsten Tag lagen dabei signifikant niedriger als die Messwerte der Uhrzeiten 12(1) Uhr bis 18 Uhr. Der Hämatokritwert um 20 Uhr stellte einen „Übergangswert“ dar, der sowohl zu dem Wert um 12(1) Uhr als auch zu dem Wert um 8 Uhr signifikant verschieden war (Abb. 26).



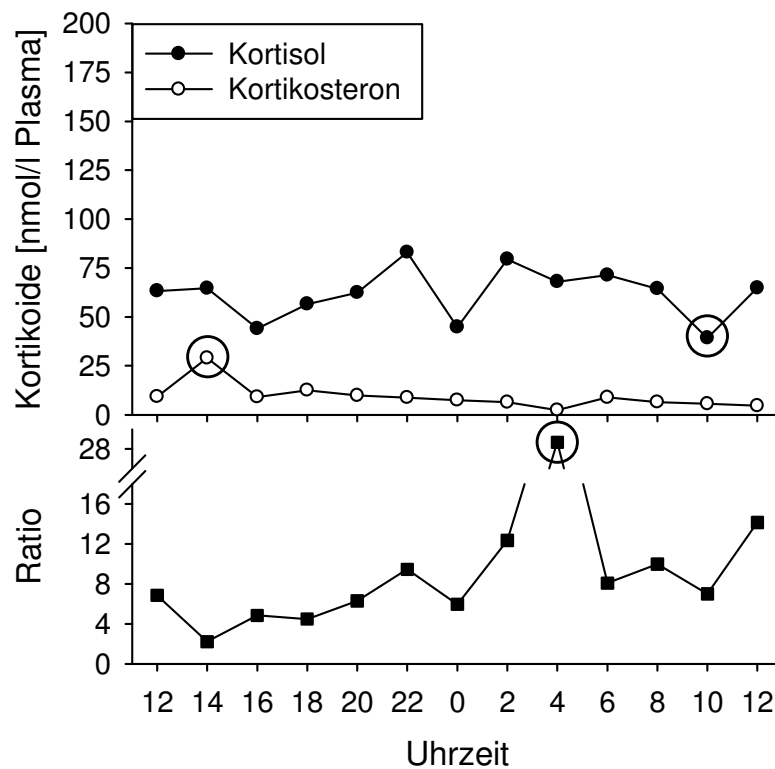
#### **4.3.5 Untersuchung und Darstellung der Einzelwerte der Glukokortikoide und ihrer Ratio jeder Katze**

In den folgenden Abbildungen (Abb. 27 bis Abb. 34) ist der Verlauf der drei Parameter Kortisol, Kortikosteron und ihrer Ratio dargestellt. Die Kreise um die jeweiligen Messzeitpunkte markieren die signifikanten Minima oder Maxima, die durch das Bestimmen der z-scores ermittelt wurden. Der z-score repräsentiert den „Abstand“ eines Wertes  $x_i$  vom Mittelwert, gemessen in Standardabweichungen. Als Abweichungen über oder unter dem Tagesmittelwert wurde ein Wert mit einem z-score über 1,65 oder unter -1,65 ( $|z| \geq 1,65$ ) gewertet. Dies entsprach dem 5 % bzw. 95 % Perzentil der Normalverteilung. Hat ein Wert einen z-score  $\leq -1,65$  wird er als Minimum bezeichnet. Analog ist ein Wert mit einem z-score  $\geq 1,65$  ein Maximum (siehe auch Kapitel 3.4.2).



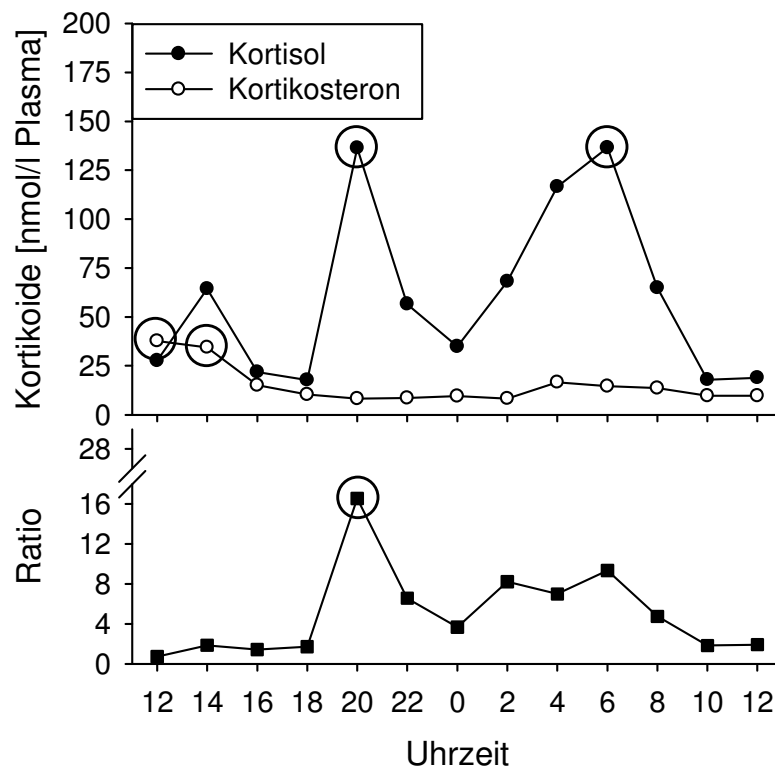
**Abb. 27: Einzeldaten der Glukokortikoide und ihrer Ratio der Katze Nr. 2031.** Kreise um einen bestimmten Datenpunkt markieren signifikante Minima oder Maxima unterhalb des 5 %-Perzentils oder oberhalb des 95 %-Perzentils der Werteverteilung ( $p < 0,05$ ;  $|z| \geq 1,65$ ).

Für die Katze Nr. 2031 konnten Maxima in der Kortisolkonzentration und in der Ratio bei den Messwerten um 16 Uhr von 120,2 nmol/l (Kortisol) und von 11,8 (Ratio) festgestellt werden. Beim Messwert um 2 Uhr morgens wurde dagegen eine signifikantes Minimum von 3,3 nmol/l in der Kortikosteronkonzentration gefunden ( $p < 0,05$ ;  $|z| \geq 1,65$ ; Abb. 27).



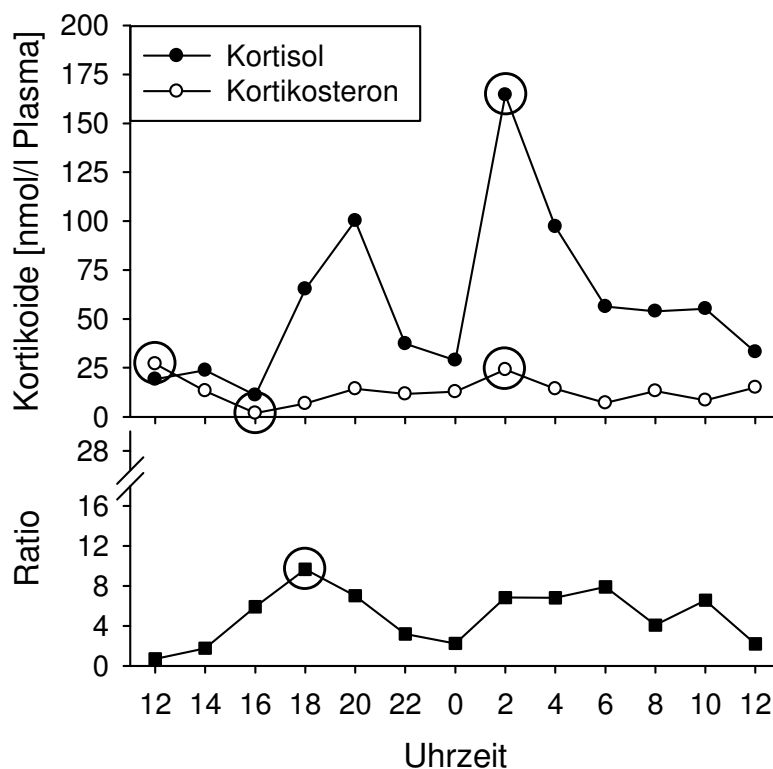
**Abb. 28: Einzeldaten der Glukokortikoide und ihrer Ratio der Katze Nr. 2032.** Kreise um einen bestimmten Datenpunkt markieren signifikante Minima oder Maxima unterhalb des 5 %-Perzentils oder oberhalb des 95 %-Perzentils der Werteverteilung ( $p < 0,05$ ;  $|z| \geq 1,65$ ).

Die Katze Nr. 2032 hatte im Verlauf der Kortisolkonzentration zum Zeitpunkt 10 Uhr ein signifikantes Minimum der Kortisolkonzentration von 39,2 nmol/l. Um 14 Uhr zeigte sich ein Maximum im Kortikosteronverlauf mit einer Konzentration von 29,0 nmol/l. Zudem kam es zu einem signifikanten Maximum um 4 Uhr von 28,7 im Ratioverlauf ( $p < 0,05$ ;  $|z| \geq 1,65$ ; Abb. 28).



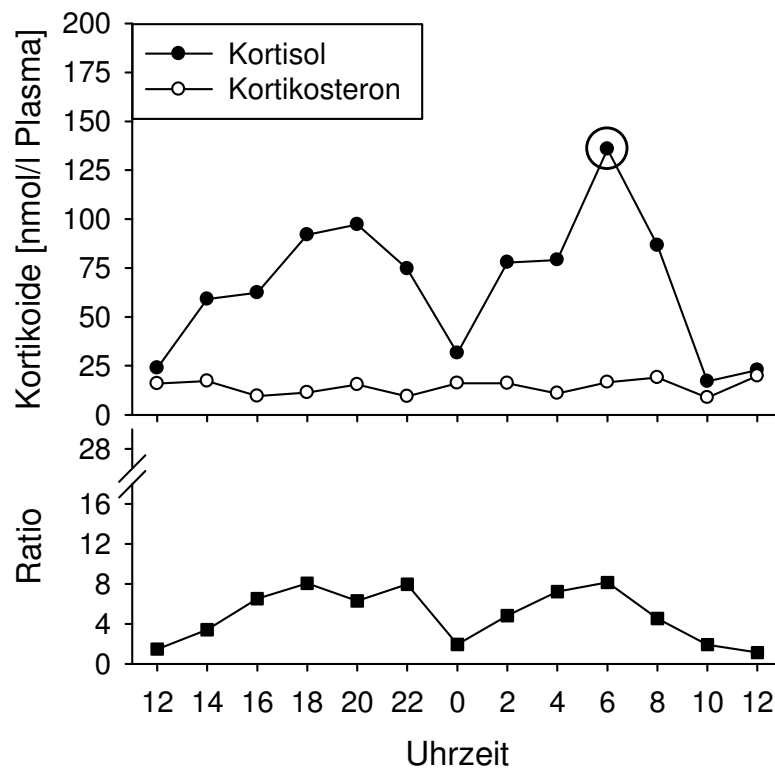
**Abb. 29: Einzeldaten der Glukokortikoide und ihrer Ratio der Katze Nr. 2040.** Kreise um einen bestimmten Datenpunkt markieren signifikante Minima oder Maxima unterhalb des 5 %-Perzentils oder oberhalb des 95 %-Perzentils der Werteverteilung ( $p < 0,05$ ;  $|z| \geq 1,65$ ).

Die Katze Nr. 2040 zeigte im Verlauf ihrer Kortisolkonzentration zwei Maxima, eines um 20 Uhr mit einem Wert von 136,4 nmol/l sowie ein weiteres um 6 Uhr mit einer Konzentration von 136,5 nmol/l. Die Ratio zeigte ebenfalls um 20 Uhr ein Maximum (16,6), da die Kortikosteronkonzentration zu diesem Zeitpunkt unverändert blieb. Letztere war lediglich bei der Messung um 12(1) Uhr (37,8 nmol/l) und um 14 Uhr mit einem Wert von 34,4 nmol/l höher als das Tagesmittel ( $p < 0,05$ ;  $|z| \geq 1,65$ ; Abb. 29).



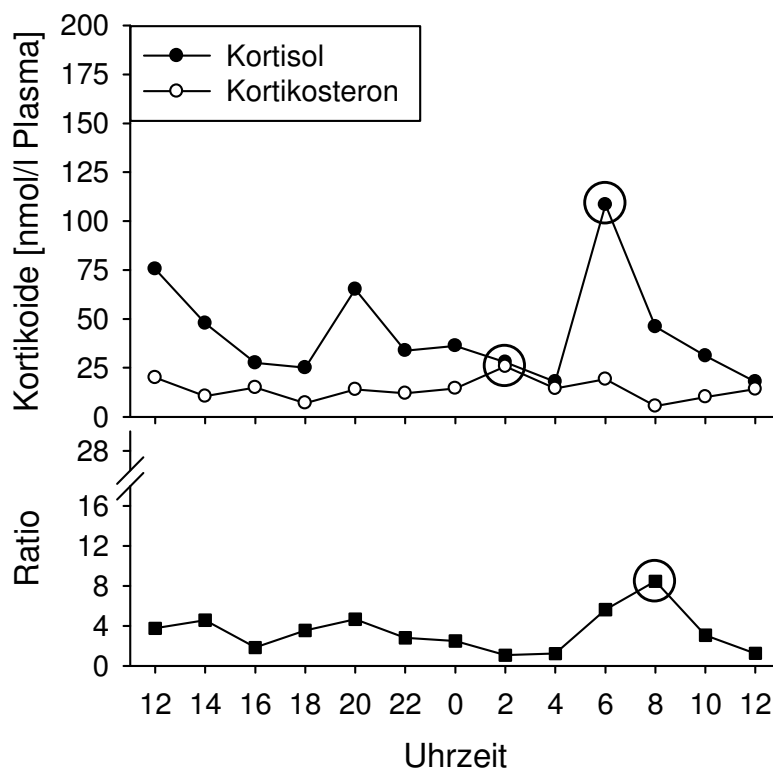
**Abb. 30: Einzeldaten der Glukokortikoide und ihrer Ratio der Katze Nr. 6549.** Kreise um einen bestimmten Datenpunkt markieren signifikante Minima oder Maxima unterhalb des 5 %-Perzentils oder oberhalb des 95 %-Perzentils der Werteverteilung ( $p < 0,05$ ;  $|z| \geq 1,65$ ).

Untersuchungen des Verlaufs der drei Parameter bei Katze Nr. 6549 zeigten ebenfalls zwei Maxima im Kortisolverlauf, wobei sich nur der Wert um 2 Uhr (164,6 nmol/l) als signifikant erwies. Der Kortikosteronverlauf hatte zum gleichen Zeitpunkt ein Maximum von 24,1 nmol/l und ein weiteres um 12(1) Uhr mit einer Konzentration von 27,0 nmol/l. Zum Zeitpunkt 16 Uhr dagegen zeigte die Kortikosteronkonzentration ein Minimum (1,9 nmol/l). Des Weiteren ergab sich im Verlauf der Ratio ein Maximum um 18 Uhr (9,7;  $p < 0,05$ ;  $|z| \geq 1,65$ ; Abb. 30).



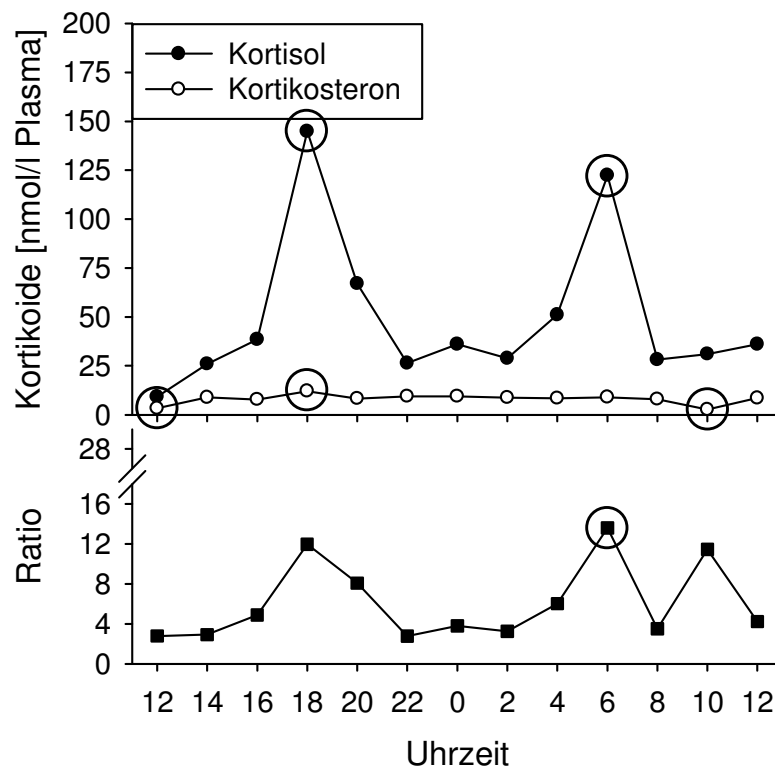
**Abb. 31: Einzeldaten der Glukokortikoide und ihrer Ratio der Katze Nr. 6558.** Kreise um einen bestimmten Datenpunkt markieren signifikante Minima oder Maxima unterhalb des 5 %-Perzentils oder oberhalb des 95 %-Perzentils der Werteverteilung ( $p < 0,05$ ;  $|z| \geq 1,65$ ).

Die Untersuchung des Verlaufs der drei Parameter Kortisol, Kortikosteron und der Ratio von der Katze Nr. 6558 ergab nur ein signifikantes Maximum in der Kortisolkonzentration um 6 Uhr mit einem Wert von 135,8 nmol/l ( $p < 0,05$ ;  $|z| \geq 1,65$ ; Abb. 31).



**Abb. 32: Einzeldaten der Glukokortikoide und ihrer Ratio der Katze Nr. 6565.** Kreise um einen bestimmten Datenpunkt markieren signifikante Minima oder Maxima unterhalb des 5 %-Perzentils oder oberhalb des 95 %-Perzentils der Werteverteilung ( $p < 0,05$ ;  $|z| \geq 1,65$ ).

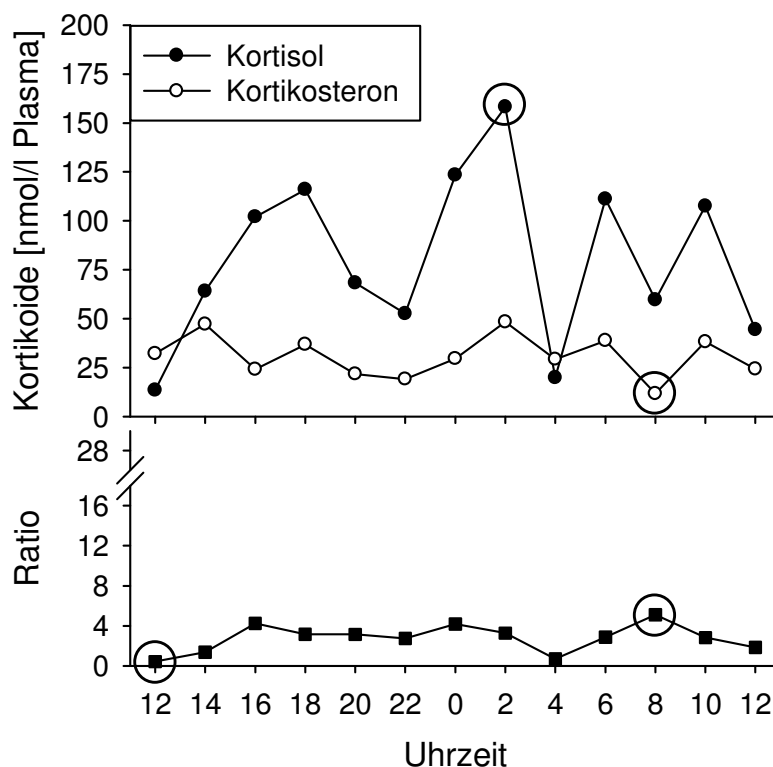
Die Analyse der Daten von der Katze Nr. 6565 ergab bei der Kortisolkonzentration ein signifikantes Maximum zum Zeitpunkt 6 Uhr mit einem Wert von 108,4 nmol/l, sowie im Ratioverlauf zum Zeitpunkt 8 Uhr (8,5). In der Kortikosteronkurve wurde ein Maximum zum Zeitpunkt 2 Uhr (25,7 nmol/l) ermittelt ( $p < 0,05$ ;  $|z| \geq 1,65$ ; Abb. 32).



**Abb. 33: Einzeldaten der Glukokortikoide und ihrer Ratio der Katze Nr. 6567.** Kreise um einen bestimmten Datenpunkt markieren signifikante Minima oder Maxima unterhalb des 5 %-Perzentils oder oberhalb des 95 %-Perzentils der Werteverteilung ( $p < 0,05$ ;  $|z| \geq 1,65$ ).

Bei diesem Tier (Katze Nr. 6567) wurden im Kortisolverlauf zwei Maxima identifiziert, eines um 18 Uhr mit einer Konzentration von 144,9 nmol/l und ein weiteres um 6 Uhr mit einem Wert von 122,4 nmol/l. In der Kortikosteronkurve wurden drei signifikante Abweichungen gefunden. Zum Zeitpunkt 12(1) Uhr ein Minimum (3,3 nmol/l), um 18 Uhr ein Maximum von 12,1 nmol/l und um 10 Uhr ein weiteres Minimum von 2,7 nmol/l. Die Untersuchung der Ratio ergab ein signifikantes Maximum zum Zeitpunkt 6 Uhr mit einem Wert von 13,6 ( $p < 0,05$ ;  $|z| \geq 1,65$ ; Abb. 33).





**Abb. 34: Einzeldaten der Glukokortikoide und ihrer Ratio der Katze Nr. 6568.** Kreise um einen bestimmten Datenpunkt markieren signifikante Minima oder Maxima unterhalb des 5 %-Perzentils oder oberhalb des 95 %-Perzentils der Werteverteilung ( $p < 0,05$ ;  $|z| \geq 1,65$ ).

Bei Katze Nr. 6568 wurde zum Zeitpunkt 2 Uhr ein Maximum in der Kortisolkonzentration mit einem Wert von 158,2 nmol/l festgestellt. Bei der Untersuchung der Kortikosteronwerte ergab sich zum Messzeitpunkt 8 Uhr morgens ein Minimum mit einer Konzentration von 11,7 nmol/l. Die Untersuchung der Ratio identifizierte sowohl ein Minimum zum Messzeitpunkt 12(1) Uhr (0,4), sowie ein Maximum zum Zeitpunkt 8 Uhr (5,1;  $p < 0,05$ ;  $|z| \geq 1,65$ ; Abb. 34).

#### 4.3.6 Untersuchung zur Identifikation eines tageszeitlichen Rhythmus bei der Katze

Um neben den durch z-scores bestimmten Maxima und Minima, signifikante Peaks in der Zeitreihe finden zu können, wurden an die Daten des 24 h Profils ein Modell aus sog. Weibull-Verteilungen angepasst. Das Ergebnis ist in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3: Darstellung der Anzahl und Vorkommen der Peaks jeder Katze des 24 h Profils**

Identifikationsnummer der Katzen	Periodizität in	Anzahl der Peaks
Nr.2031	<i>keine</i>	0
Nr.2032	<i>keine</i>	0
Nr.2040	Kortisol	4
Nr.6549	Kortisol	6
	Ratio	6
Nr.6558	<i>keine</i>	0
Nr.6565	Ratio	6
	Kortikosteron	6
Nr.6567	Ratio	7
Nr.6568	Kortisol	6
	Kortikosteron	7

Drei Katzen wiesen signifikante Peaks im Kortisolverlauf auf. Dabei hatten zwei Katzen, Nr. 6549 und Nr. 6568, eine Anzahl von sechs Peaks, während bei Katze Nr. 2040 vier Spitzen identifiziert wurden. Ebenfalls bei drei Katzen (Nr. 2031, Nr. 2032 und Nr. 6558) konnten bei keinem der drei Parameter ein signifikanter Peak gefunden werden. Im Kurvenverlauf der Ratio wurden bei weiteren drei Tieren Peaks identifiziert: dabei hatte Katze Nr. 6549 (sechs Peaks) auch schon signifikante Peaks im Kortisolverlauf, Katze Nr. 6565 zeigte ebenfalls sechs Peaks und Katze Nr. 6567 sieben signifikante Spitzen in der Ratio. Nur zwei Tiere (Nr. 6565, sechs und Nr. 6568, sieben) hatten signifikante Spitzen im Verlauf der Kortikosteronkonzentration.

**Tabelle 4: Darstellung eines gleichen Zeitpunktes von Peaks und Maxima aller drei Parameter jeder Katze des 24 h Profils.** P: Peaks der Weibullverteilung (siehe Kapitel 4.3.6); M: Maxima durch z-scores ermittelt ( $p < 0,05$ ;  $|z| \geq 1,65$ ; siehe Kapitel 4.3.5). Id.Nr.: Identifikationsnummer; *keine Übereinstimmung*: es wurden keine Peaks und Maxima zur gleichen Uhrzeit gefunden.

<b>Id.Nr. der Katzen</b>	<b>Kortisol Peaks (P) und Maxima (M; Uhrzeit)</b>	<b>Kortikosteron Peaks (P) und Maxima (M; Uhrzeit)</b>	<b>Ratio Peaks (P) und Maxima (M; Uhrzeit)</b>
6558	6 Uhr (P + M)	<i>Keine Übereinstimmung</i>	<i>Keine Übereinstimmung</i>
6567	6 Uhr (P + M) und 18 Uhr (P + M)	18 Uhr (P + M)	6 Uhr (P + M)
6549	6 Uhr (P + M)	2 Uhr (P + M)	18 Uhr (P + M)
6565	5 Uhr (P) und 6 Uhr (M)	2 Uhr (P + M)	7 Uhr (P) und 8 Uhr (M)
2032	<i>Keine Übereinstimmung</i>	<i>Keine Übereinstimmung</i>	4 Uhr (P + M)
2040	19 Uhr (P) und 20 Uhr (M)	<i>Keine Übereinstimmung</i>	20 Uhr (P + M)
2031	15 Uhr (P) und 16 Uhr (M)	<i>Keine Übereinstimmung</i>	<i>Keine Übereinstimmung</i>
6568	1 Uhr (P) und 2 Uhr (M)	<i>Keine Übereinstimmung</i>	<i>Keine Übereinstimmung</i>

In Tabelle 4 sind die Beziehung zwischen den Peaks aus der Weibull-Verteilung und den durch die z-scores ermittelten Maxima dargestellt. Drei Katzen (Nr. 6558, Nr. 6567, Nr. 6549) zeigten Peaks und Maxima in der Kortisolkonzentration zur gleichen Uhrzeit (6 Uhr). Katze Nr. 6565 wich davon nur geringfügig ab, bei ihr lag der Peak 1 h vor dem Maximum. Zwei Katzen (Nr. 6549 und Nr. 6565) zeigten in der Kortikosteronkonzentration um 2 Uhr einen Peak und ein Maximum. Dagegen zeigte Katze Nr. 2032 nur in der Ratio eine Übereinstimmung zwischen Peak und Maximum um 4 Uhr.

## 4.4 Weiterführende Analysen

### 4.4.1 Korrelation zwischen Kortisol, Kortikosteron und ihrer Ratio

Um eine Aussage über die Art (gleich oder unterschiedlich) des Regulationsmechanismus der beiden GK Kortisol und Kortikosteron machen zu können, wurden die Einzeltierdaten des 24 h Profils mittels der Korrelation nach Spearman darauf untersucht, ob es zwischen der Kortisolkonzentration und Kortikosteronkonzentration und/oder der Ratio eine signifikante Abhängigkeit gibt.

Es konnte zwischen Kortisol und Kortikosteron keine Korrelation festgestellt werden. Die Korrelationskoeffizienten bewegten sich zwischen  $r_{\min} = -0,225$  und  $r_{\max} = 0,484$ ; das niedrigste Signifikanzniveau lag bei  $p = 0,0892$ .

Dagegen ließ sich bei allen Tieren eine signifikante Korrelation der Ratio mit der Kortisolkonzentration feststellen. Die Korrelationskoeffizienten lagen in diesem Fall zwischen  $r_{\min} = 0,588$  und  $r_{\max} = 0,885$ . Korrelationen mit einem Wert  $p \leq 0,05$  wurden als signifikant angegeben.

Zwischen Kortikosteron und der Ratio konnte nur bei einer Katze (Nr. 2032) eine signifikante negative Korrelation festgestellt werden ( $r = -0,852$ ,  $p \leq 0,05$ ; Korrelation nach Spearman).

#### **4.4.2 Untersuchung der Streuung in Kortisol, Kortikosteron und ihrer Ratio**

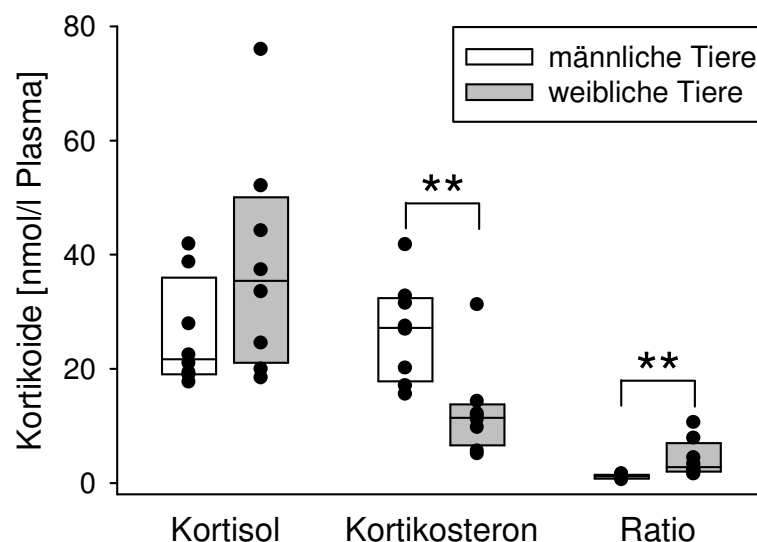
Das Ziel dieser statistischen Analyse war es herauszufinden, welcher der drei Parameter (Kortisol, Kortikosteron und die Ratio) die kleinste Streuung aufwies, was darauf hindeuten könnte, welcher Parameter am besten für die Beurteilung der Stressreaktion bei Katzen geeignet wäre. Dafür wurden die Standardabweichungen der Werte innerhalb des 24 h Profils jeder Katze bei allen drei Parametern berechnet und miteinander verglichen.

Die Standardabweichungen der Kortisolkonzentrationen lagen zwischen 13,1 und 44,1 nmol/l, die Kortikosteronkonzentrationen zwischen 2,5 und 10,8 nmol/l. Die Standardabweichung der Ratiowerte lag zwischen 1,4 und 6,7. Die Standardabweichungen der drei Parameter unterschieden sich dabei signifikant voneinander (One Way ANOVA), wobei die Ratio und Kortikosteron geringere Standardabweichungen als Kortisol aufweisen ( $p < 0,05$ ; SNK).

#### 4.4.3 Geschlechterabhängigkeiten

Neben den Untersuchungen zur Geschlechterabhängigkeit im ACTH-Stimulationstest wurde versucht, die Daten der männlichen Tiere aus dem Stressversuch mit den Daten der weiblichen Tiere aus dem 24 h Profil zu vergleichen. Aufgrund der großen Variabilität der GK-Konzentrationen wurde versucht, Daten auszuwählen, die um den Zeitpunkt 11 Uhr in beiden Versuchen genommen wurden. Dafür wurden bei den männlichen Tieren die Mittelwerte der Messwerte zu den Zeitpunkten  $t = 0$  bis  $t = 45$  min herangezogen. Bei den weiblichen Tieren wurde der Mittelwert aus den um 10 Uhr und 12 Uhr bestimmten Konzentrationen berechnet.

Im Geschlechtervergleich (Abb. 35) der Kortikosteronkonzentrationen konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p < 0,01$ ;  $t$ -Test). Auch im Vergleich der Ratiowerte konnte eine Signifikanz identifiziert werden ( $p < 0,01$ ; Rangsummentest nach Mann-Whitney).



**Abb. 35: Darstellung der Glukokortikoide und ihrer Ratio im Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Tieren.** Erhobene Datengrundlage dieser Abbildung ist im Kapitel 3.4.1 sowie im Kapitel 4.4.3 beschrieben. Boxplot mit Einzeltierdaten (Punkte).  $n = 8/8$ . \*\*: signifikante Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren zum selben Entnahmezeitpunkt ( $p < 0,05$ ;  $t$ -Test).

## 5. Diskussion

In der Literatur sind viele Studien zu Kortisol bei der Katze beschrieben, aber es sind kaum Angaben zur Kortikosteronkonzentration vorhanden. Bei anderen Tierarten wie dem Hamster und dem Kaninchen stellten sich bei der Untersuchung der Kortikosteronkonzentration zusätzlich zur Kortisolkonzentration im Plasma neue Erkenntnisse bezüglich der Konzentrationsmenge und des Sekretionsmusters der beiden Glukokortikoide (GK) heraus (ALBERS et al. 1985, SZETO et al. 2004). Durch andere Autoren gilt es als gesichert, dass die Katze beide GK bildet (BUSCH 1953, ILETT und LOCKETT 1969, YOUNG et al. 2002). Eine interessante Fragestellung im Rahmen der eigenen Untersuchung war daher, wie sich die Kortikosteronkonzentration unter Einfluss eines Stressors sowie unter physiologischen Bedingungen im Vergleich zur Kortisolkonzentration verhält. Eventuell ließe sich daraus eine präzisere Aussage über die Reaktion auf einen milden Stressor machen.

Des Weiteren stellten ALBERS et al. (1985) fest, dass die Ratio aus Kortisol und Kortikosteron mit den absoluten GK-Konzentrationen im Plasma korrelierte. Gleichzeitig erhöhte sich die Ratio mit der Menge der ausgeschütteten GK im Plasma sowohl unter der Einwirkung eines Stressors als auch unter Ruhebedingungen (ALBERS et al. 1985). Basierend auf dieser Studie erschien eine Berechnung der Ratio als sinnvoll, um weitere Erkenntnisse über die Sekretion der beiden GK Kortisol und Kortikosteron bei der Katze zu bekommen. Eine Beurteilung in beiden Fällen, unter Einwirkung eines milden Stressors, sowie in der Sekretion über 24 h, würde eventuell neue Informationen über die GK-Ausschüttung und GK-Verteilung und damit wiederum über ihre Regulationsmechanismen geben.

In der Literatur gibt es widersprüchliche Angaben zur tageszeitlichen Rhythmik der Kortisolkonzentration bei der Katze. Einige Autoren wiesen eine solche Rhythmik bei der Katze nach (KRIEGER et al. 1968, SCOTT et al. 1978), andere wiederum konnten keine Tagesrhythmik in der Kortisolkonzentration feststellen (JOHNSTON und MATHER 1979, LEYVA et al. 1984). In der Arbeit von KEMPPAINEN und PETERSON (1996) wurde eine episodische Sekretion von Kortisol bei der Katze

nachgewiesen, einen tageszeitabhängigen Verlauf jedoch nicht. Aufgrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse der verschiedenen Studien lag die Frage nahe, inwieweit die Katze, neben der episodischen Sekretion der GK, eine tageszeitliche Rhythmik in der Sekretion von Kortisol und auch von Kortikosteron haben könnte. Eine weitere Fragestellung war auch, ob durch die Bestimmung der Kortikosteronkonzentration und durch die Berechnung der Ratio aus den beiden GK weitere Erkenntnisse bezüglich der Periodizität zu gewinnen wären.

Die oben genannten Fragestellungen setzen alle eine möglichst stressfreie Blutentnahme voraus, um nicht durch Zwangsfixation der Tiere während der Blutentnahmen eine Beeinflussung der GK-Konzentrationen hervor zu rufen. In den Studien von Morrison et al. (2007) und Henry et al. (2002) wurde das total implantierte Portkathetersystem (*venous access port* (VAP)-System) bei der Katze eingesetzt und erwies sich in beiden Untersuchungen als praktikabel. Somit erschien dies eine adäquate Lösung, um die Blutentnahmen so stressfrei wie möglich zu gestalten. Das VAP-System besteht aus einer unter der Haut fixierten Titankammer mit Silikonmembran an die ein Polyurethankatheter adaptiert ist. Allen Tieren wurde der Katheter über die linke Vena jugularis externa in die vordere Hohlvene (Vena cava cranialis) implantiert, an die Titankammer adaptiert und diese an der linken Brustwand unter der Haut fixiert (siehe Kapitel 3.3.2).

Vor dem eigentlichen Versuchsbeginn musste eine physiologische Funktion der Nebenniere (NN) und der HPA-Achse überprüft werden. Ein ACTH-Stimulationstest mit Blutentnahmen vor, 45 und 90 min nach ACTH-Injektion wurde durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.1). Dabei fielen geschlechtsspezifische Unterschiede auf.

Der anschließende Versuchsaufbau wurde in zwei Einzelversuche unterteilt. Zum einen in den Stressversuch und zum anderen in das 24 h Profil. Beim Stressversuch wurde acht Katzen Blut in einer hohen Frequenz (5, 10 und 15 min Abstände) entnommen, um eventuell die pulsatile Ausschüttung der GK besser beurteilen zu können. 90 min nach Versuchsbeginn wurden die Katzen einem milden Stressor in Form eines 3 minütigen Duschbads ausgesetzt. Anschließend wurden die frequenten Blutentnahmen zur besseren Beurteilung der



Stressreaktion bis 90 min nach dem milden Stressor fortgesetzt (siehe Kapitel 3.3.4).

Zur Untersuchung der tageszeitlichen Rhythmik der GK wurde acht weiblichen Tieren über 24 h durch das VAP-System in 2-h-Intervallen Blut entnommen. Es wurde auf eine minimale Störung der Tiere geachtet, indem während der Nachtphase eine kleinstmögliche Benutzung von Weißlicht angestrebt wurde. Da die Versuche im September stattfanden, war eine 12 hTag/12 h Nacht-Rhythmik gewährleistet (siehe Kapitel 3.3.5).

In den Untersuchungen (ACTH-Stimulationstest, Stressversuch und 24 h Profil) wurden jeweils die Kortisol und Kortikosteronkonzentration bestimmt, die Ratio berechnet und der Hämatokrit gemessen. Die Bestimmung der GK-Konzentrationen erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC).

Die Verwendung des VAP-Systems bei der Katze stellte sich in der eigenen Untersuchung als sehr zufriedenstellend heraus. Die Narkoseeinleitung und die Aufwachphase, sowie die Anästhesie während der Portimplantation verliefen bei allen Tieren ohne Zwischenfälle. Die Operationsdauer lag zwischen 35 bis 160 Minuten. Je mehr Operationen der Operateur durchführte, desto kürzer war die Operations- und Anästhesiedauer. Dies stellten auch MORRISON et al. (2007) fest, nachdem sie acht Katzen ein VAP-System eingesetzt hatten.

Es wurde bei keiner der Katzen mittel- bis hochgradige Komplikationen nach Implantation des Ports beobachtet. Wundinfektionen waren nicht zu beobachten. Lediglich eine Katze (Nr. 6565) wurde aufgrund von Schwäche, leichter Dehydratation und Untertemperatur, für drei Tage tierärztlich versorgt. In zwei Fällen (Nr. 6559 und Nr. 2127) lösten sich die Befestigungshefte des Ports, so dass er sich unter der Haut einmal um seine eigene Achse drehte. Beide Tiere zeigten dabei keine klinischen Symptome. Kater Nr. 6559 wurde erneut operiert, um den Port wieder an den Hautmuskeln sicher zu befestigen. Bei Kater Nr. 2127 drehte sich der Port selbständig in seine ursprüngliche Lage zurück, ohne den Katheter abzuknicken, so dass das Tier am nächsten Tag dem Stressversuch

unterzogen wurde, um weitere Komplikationen zu verhindern. Bei allen Katzen war eine ausreichende Rekonvaleszenz nach dem operativen Eingriff und nach dem Auftreten der Komplikationen gewährleistet, so dass alle Tiere am Tag des jeweiligen Versuches bei gutem Allgemeinbefinden klinisch gesund waren.

Die Durchgängigkeit des Kathetersystems war durch das regelmäßige Spülen gewährleistet. Dennoch kam es in seltenen Fällen zu Blockaden des Katheters sowohl beim Spülen als auch während der Versuche. Manchmal musste mehrmals vor den Versuchen gespült werden, um Blut gewinnen zu können. Während des Stressversuchs kam es bei den Blutentnahmen mit kurzen Zeitabständen zur Blockade des Katheters, die eventuell durch ein vor der Katheterspitze sitzenden Thrombus oder ein Abknicken des Katheters hervorgerufen wurde. Bei einer Katze (Nr. 6567) konnte während des 24 h Profils beobachtet werden, dass dies bei einer bestimmten Kopfhaltung (Flexion nach ventral) auftrat. Auch ein Ansaugen der Katheterspitze aufgrund des negativen Drucks durch das Anziehen der Spritze wäre denkbar, da wenige Tiere sich während der Ansaugversuche, bei denen nicht sofort Blut zu gewinnen war, eine leichte Schmerzreaktion zeigten.

Alle VAP-Systeme funktionierten einwandfrei bis zum Tag der operativen Entfernung, einen Monat nach der Implantation. Alle Katzen gewöhnten sich im Laufe der Spülungen an den Vorgang und zeigten keinerlei Aggressionen.

Die Anwendung des VAP-Systems bei der Katze ist eine Methode, die sich in den letzten Jahren im Versuchstier- wie im Heimtierbereich etabliert hat. Sie gewährleistet eine sichere und stressarme Blutentnahme und kann über einen längeren Zeitraum genutzt werden. Die Implantation über die V. jugularis externa erwies sich, wie bei MORRISON et al. (2007) und auch bei Henry et al. (2002), als praktikabel. Die Vorteile, die MORRISON et al. (2007) in ihrer Studie gegenüber einer konventionellen Venenpunktion aufzählen, konnten (im eigenen Vergleich mit der Blutentnahme des ACTH-Stimulationstests) bestätigt werden: eine höhere Akzeptanz bei den Tieren, es wurde weniger Personal benötigt und die Blutentnahmezeit verkürzte sich.

## 5.1 Stresstest

### 5.1.1 Glukokortikoidkonzentration vor und nach dem milden Stressor

Im Stresstest stieg vor allem die Konzentration von Kortisol als Reaktion auf den Stressor „Dusche“ signifikant an (Abb. 11). Verschiedene Autoren wiesen einen signifikanten Anstieg der Kortisolkonzentration bei verschiedenen anderen Stressoren nach (WILLEMSE et al. 1993, CARLSTEAD et al. 1993, SMITH et al. 1999, GENARO et al. 2007).

Auch bei RAND et al. (2002) erhöhte sich die Kortisolkonzentration im Plasma am Ende einer 5-minütigen Dusche. Dort kam es nach dem schnellen Anstieg (91,1 nmol/l Plasma) nach Einwirkung des milden und kurzzeitigen Stressors Dusche nicht zu einem Abfall der Kortisolkonzentration. Sie verweilte bis zum Ende des Versuches (82,8 nmol/l Plasma, 100 min nach der Dusche) auf einem Plateau. In der eigenen Untersuchung war die maximale Kortisolkonzentration im Plasma ( $t = 105 \text{ min}$ :  $233,3 \pm 16,1 \text{ nmol/l Plasma}$ ) sehr viel höher als bei RAND et al. (2002), zudem kam es danach zu einem kontinuierlichen Abfall 25 min nach der Dusche ( $t = 180 \text{ min}$ :  $63,7 \pm 17,0 \text{ nmol/l Plasma}$ ; Abb. 11). Da der milde Stressor Dusche ein akuter Stressor von 3 min Dauer war, war die Reaktion auf ihn (schneller, hoher Anstieg, baldiger kontinuierlicher Abfall) in der eigenen Untersuchung ein zu erwartender Verlauf. Auch die guten Versuchsbedingungen (einheitlicher Tierbestand, entsprechende Räumlichkeiten), die eine geringstmögliche Beeinflussung der Stressantwort durch andere externe Faktoren ermöglichten, trugen zu dieser erwarteten Antwort bei.

Die Dusche als milder Stressor wird bei RAND et al. (2002) als gut standardisierbarer Stressor, der zeitlich begrenzt anwendbar ist, jederzeit wiederholbar ist und ethisch als akzeptiert gilt. Dies konnte in den eigenen Untersuchungen bestätigt werden, da die Tiere direkt nach der Dusche ähnliche Verhaltensmuster wie vor der Dusche zeigten. Zudem wurden die Katzen in der eigenen Untersuchung, anders wie RAND et al. (2002) beschrieben, nicht in einem Geschirr fixiert, sondern befanden sich in einem Zwangskäfig. Dies erleichterte Handling und Transport zur Duscheinrichtung und erschien für die Katzen ein geringerer Stressor zu sein als eine zusätzliche Fixation.

Unterschiedliche Reaktionen der Tiere auf ihre Positionierung auf dem Arm einer sitzenden Person im Stressversuch könnten den ungewollten Anstieg der Kortisolkonzentration im Plasma vor der Einwirkung des milden Stressors erklären. Obwohl versucht wurde den Tieren eine angenehme Umgebung (Futter, Streicheln) auf dem Arm der haltenden Person zu verschaffen, ließ sich ein durch Handling hervorgerufener Anstieg der Kortisolkonzentration vor der Dusche nicht vermeiden (Abb. 11).

Die Kortikosteronkonzentration im Plasma wies einen geringgradigen, nicht signifikanten Anstieg nach der Dusche auf und war 10 min danach ( $t = 105$  min) wieder bei den Konzentrationen vor dem milden Stressor angekommen (Abb. 12). Dennoch erfolgte der Anstieg der Kortikosteronkonzentration gleichzeitig mit der Kortisolkonzentration und reagierte damit auch auf den milden Stressor. So kann man davon ausgehen, dass die stressinduzierte Synthese von Kortikosteron wie auch Kortisol in der NN und ihre Abgabe ins Blut über den gleichen übergeordneten Regulationsmechanismus gesteuert ist. Nach Einwirkung eines Stressors wird die Synthese beider GK über die Aktivierung der HPA-Achse ausgelöst. Über Neurotransmitter und Neuropeptide wird die Bildung von *corticotropin releasing hormone* (CRH) und Arginin Vasopressin (AVP), auch antidiuretisches Hormon (ADH) genannt, im Hypothalamus veranlasst. Diese führen im Hypophysenvorderlappen zur Synthese von adrenokortikotropen Hormon (ACTH) aus dem Präkursormolekül, Pro-opiomelanocortin (POMC). Daraufhin wird ACTH ins periphere Blut abgegeben und dockt an den Rezeptoren der Zellen der Zona fasciculata der Nebennierenrinde (NNR) an (CHARMANDARI et al. 2005, LIGHTMAN 2008). Durch diesen Ligand-Rezeptor-Komplex wird über verschiedene Zwischenschritte die Transkription des *steroidogenic acute regulatory* (StAR) Protein veranlasst. StAR bindet das aus dem Blut in die Zelle gelangte Cholesterol und transportiert es in die innere Mitochondriummembran. Dies ist der limitierende Schritt, der im Mitochondrium beginnenden GK-Biosynthese (SEWER et al. 2007; siehe Kapitel 2.3.5).

Wenn man die Einzeltierdarstellungen der acht Kater betrachtet, fällt auf, dass bei einigen Tieren (Nr. 2120: Abb. 15; Nr. 2127: Abb. 17; Nr. 6559: Abb. 19 und Nr. 6564: Abb. 21) die Kortisol- und die Kortikosteronkonzentrationen im Plasma

ähnlich verliefen, wobei der Konzentrationsanstieg nach Einwirkung des milden Stressors auf einem viel niedrigeren Niveau stattfand als bei Kortisol. In der Studie von YOUNG et al. (2002) wurden Kortisol- und Kortikosteronkonzentrationen im Kot von zwei Katzen und anderen Wildfeliden untersucht. Sie führten zudem einen ACTH-Stimulationstest durch. Dabei zeigte sich bei den Katzen ein paralleler Anstieg von Kortisol und Kortikosteron unter Stresseinwirkung und während eines ACTH-Stimulationstests (YOUNG et al. 2002). Da diese Untersuchung auf der Analyse von Kotproben basierte, sind die Ergebnisse großen Variationen durch die Dauer der Ausscheidung unterworfen, und können deswegen nicht als direkte Vergleichsstudie herangezogen werden. Die Studie gibt lediglich einen Anhaltspunkt, dass die Regulation der GK-Synthese vorrangig über die HPA-Achse verläuft.

Andere Tiere (Nr. 2125: Abb. 16; Nr. 2128: Abb. 18 und Nr. 6563: Abb. 20) dagegen zeigten im Verlauf der Kortikosteronkonzentration im Plasma keine Parallelität zur Kortisolkonzentration, sondern wiesen sehr unterschiedliche Verläufe der beiden GK auf. Möglich ist, dass die Kortikosteronproduktion aufgrund eines spezifischen negativen Rückkopplungsmechanismus heruntergefahren wurde. Ein anderer Grund könnte sein, dass ein unterschiedlicher Regulationsmechanismus für die Kortisol- und Kortikosteronsynthese in der NNR, neben der übergeordneten Regulation über die HPA-Achse, existiert. Parakrinen und nervalen Neurotransmittern und Neuropeptiden wurde ein selektiver Einfluss auf die Ausschüttung einzelner Steroidhormone nachgewiesen, allerdings war dies auf einzelne Tierarten und Versuchsmodele beschränkt (ERHART-BORNSTEIN et al. 1998). ENGLER et al. (1999) stellten die Theorie eines inhibitorischen Faktors von CRH (*corticotropin-release-inhibitory factor*, CRIF) auf, der verschiedene Postulate erfüllen sollte. Sie nannten die folgenden. Erstens: CRIF wirkt an normalen ACTH-produzierenden Zellen des Hypothalamus, um eine basale ACTH-Sekretion und einen CRH- bzw. AVP-induzierten Anstieg von ACTH zu dämpfen. Zweitens: CRIF blockiert die Proopiomelanocortin(POMC)-Genexpression im Hypothalamus. Drittens: eine Blockade von CRIF würde einen Anstieg der basalen ACTH-Sekretion hervorrufen und damit die Freisetzung von ACTH durch physiologische Stimuli verstärken. Viertens: CRIF ist in Nervenendigungen der medianen Eminenz des

Hypophysenstiels vorhanden und kann im adenohipophysären Pfortadersystem gefunden werden. Fünftens: CRIF bindet an einen spezifischen Rezeptor im Hypophysenvorderlappen. Falls eine solche Substanz gefunden werden würde, könnte dies ein neuer Rückkopplungsmechanismus sein, der sich eventuell auch auf die Kortikosteronkonzentration auswirkt.

Bezüglich der eigenen Untersuchungen, wäre es auch möglich, dass der Stressor für eine stärkere Reaktion der Kortikosteronkonzentration in Dauer und Intensität nicht ausgereicht haben könnte. Anhaltspunkt hierfür ist die langsamere Reaktion der Kortikosteronkonzentration auf die ACTH-Injektion (Abb. 8). Beim Stressversuch hatte die Kortikosteronkonzentration kaum eine Reaktion auf den milden Stressor gezeigt (Abb 12). In weiterführenden Untersuchungen mit Anwendung eines starken oder chronischen Stressors könnte dies überprüft werden. Auch RAUBENHEIMER et al. (2006) äußerten die Vermutung, dass Kortikosteron bei einem geringen dauerhaften Stressor eine Rolle spielen könnte. In ihrer Studie reagierte Kortikosteron bei supraphysiologischer (0,04 mg/kg i. v.) Injektion von ACTH beim Menschen stärker als bei der physiologischen Menge (0,15 mg/kg ACTH i. v.; RAUBENHEIMER et al. 2006). Die in dieser Arbeit gefundenen unterschiedlichen Verläufe von Kortisol und Kortikosteron könnten aber durchaus auch individuelle Unterschiede sein, zumal vier von acht Tieren (Nr. 2120: Abb. 15; Nr. 2127. Abb: 17; Nr. 6559: Abb. 19 und Nr. 6564: Abb. 21) einen ähnlichen Verlauf beider GK-Konzentrationen aufweisen.

### 5.1.2 Hämatokrit

Bei Betrachtung des Verlaufs der Hämatokritwerte während des Stressversuchs fällt auf, dass dieser nach Einwirken des milden Stressors sehr schnell und deutlich ansteigt und anschließend rasch wieder abfällt (Abb. 14). Dieser Kurvenverlauf ist zu denen der anderen drei Parameter (Kortisol-, Kortikosteronkonzentration und Ratio) verschieden (Abb. 11 - 13). So liegt die Vermutung nahe, dass diese schnelle, stressbedingte Erhöhung des Hämatokrits einem anderen Regulationsmechanismus als dem der GK unterliegt. Die sekundenschnelle Aktivierung des sympathischen Nervensystems aufgrund des milden Stressors Dusche ist sehr wahrscheinlich. Durch die Ausschüttung von

Katecholaminen (Adrenalin und Noradrenalin) aus den Nervenendigungen kommt es in der Milz zur Kontraktion der glatten Muskulatur der Kapsel und damit zu einer Entleerung der Erythrozytenspeicher der Milz (BREZNOCK und STRACK 1982a und 1982b). Auch durch die Katecholamin-verursachte Steigerung des Blutdrucks kann es zu einer Erhöhung des Hämatokrits kommen. Indem sich der hydrostatische Druck in den peripheren Kapillaren ändert, wird mehr intravasale Flüssigkeit ins Interstitium verlagert. Dies wiederum führt zu einer Erhöhung des Hämatokrits (ALLEN und PATTERSON 1995).

Die Wirkung von GK auf den Hämatokrit wirkt den oben genannten Mechanismen entgegen. Durch Belegung der Mineralokortikoidrezeptoren (MK-Rezeptoren) durch GK kommt es nach einer Natriumretention zu einer Wasserretention in der Niere wodurch die Anzahl der roten Blutkörperchen relativ zum Gefäßvolumen sinkt (AURICH 2002). Dies kann aber nicht ursächlich für das schnelle Absinken des Hämatokrit sein, da die GK zu dem Zeitpunkt des Hämatokritabfalls erst angestiegen sind.

## 5.2 24 h Profil

### 5.2.1 Glukokortikoide

Bei Betrachtung der einzelnen Verläufe der Kortisol- und Kortikosteronkonzentrationen (Abb. 23 und 24) und ihrer Ratio (Abb. 25) fallen große individuelle Unterschiede auf. Des Weiteren fällt auf, dass relativ hohe Kortisolkonzentrationen erreicht wurden ( $95,8 \pm 14,4$  nmol (6 Uhr); Abb. 23). Dies könnte ein Hinweis eine stressbedingte Ausschüttung sein. Da aber die Blutentnahmen durch das VAP-System über 24 h so stressfrei wie möglich abliefen, ist dies eher unwahrscheinlich. Vielmehr handelte es sich wohl um individuelle Anstiege, bedingt durch die episodische Sekretion der GK aus der NNR (KEMPPAINEN und PETERSON 1996). Auch auf der übergeordneten Ebene (Hypothalamus und Hypophyse) werden die Hormone pulsatil ausgeschüttet und es wird bei der Ratte von großen individuellen Schwankungen berichtet (ENGLER et al. 1999).

Dennoch fallen bei Betrachtung des Kortisolkonzentrationsverlaufs (Abb. 23) und dem Verlauf der Ratio (Abb. 25) bei der Hälfte der Tiere zwei, in der individuellen Rhythmik ersichtliche, Maximumpunkte auf (Nr. 2040: Abb. 29, Nr. 6549: Abb. 30, Nr. 6558: Abb. 31, Nr. 6567: 33). Der erste befand sich um 20 Uhr und der zweite Maximumpunkt trat gegen 6 Uhr auf, diese hoben sich allerdings weder in der Kortisolkonzentration noch in der Ratio signifikant von den anderen Werten ab. Um 6 Uhr morgens zeigten zudem vier Tiere (Nr. 2040: Abb.29, Nr. 6558: Abb. 31, Nr. 6565: Abb. 32, Nr. 6567: Abb. 33) ein gemeinsames Maximum in der Kortisolkonzentration (z-score). Dies lässt eine Periodizität vermuten, wie sie beim Menschen mit einem Maximum der Konzentration in den frühen Morgenstunden und niedrigen Werten am Abend gefunden wurde (ORTH und KOVACS 1998). Auch verschiedene andere Tierarten zeigen eine Periodizität in der Kortisolkonzentration. Pferde und Bullen haben einen ähnlichen Verlauf wie der Mensch (THUN et al. 1981, IRVINE und ALEXANDER 1994), während die tageszeitliche Rhythmik bei Schafen, Kaninchen und Hamstern von der des Menschen abweicht (FULKERSON und TANG 1979, ALBERS et al. 1985, SZETO et al. 2004). In der statistischen Auswertung war dieser zweiphasige Verlauf jedoch nicht signifikant unterschiedlich zu den anderen Messpunkten.



Des Weiteren ist zu beobachten, dass die niedrigsten Kortisolkonzentrationen während der 24 h um 10 Uhr ( $33,6 \pm 8,4$  nmol/l) und um 12 Uhr ( $40,3 \pm 10,6$  nmol/l) gemessen wurden (Abb. 23). Diese niedrigen Konzentrationen waren ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich zu den übrigen Kortisolkonzentrationen im Verlauf. Unter der Annahme, dass es keine geschlechterspezifischen Unterschiede in der Kortisolkonzentration gab, macht dies deutlich, dass der Tageszeitpunkt für den Stressversuch (zwischen 11 und 14 Uhr) richtig gewählt war. Damit war der Anstieg nach dem Stressor rein durch diesen verursacht und wurde weniger durch tageszeitliche Schwankungen der Kortisolkonzentration im Plasma beeinflusst. Zwar wurde das 24 h Profil mit weiblichen Tieren und der Stressversuch mit männlichen Tieren durchgeführt, doch haben die eigenen Untersuchungen gezeigt, dass es um 11 Uhr keinen Unterschied in der Kortisolkonzentration zwischen männlichen und weiblichen Tieren gegeben hat (Abb. 35). Demnach kann man davon ausgehen dass ein 24 h Profil der Kater ähnliche niedrige Konzentrationen um 10 und 12 Uhr gezeigt hätte, da die Kater in den ersten 45 min des Stressversuchs vergleichbare Konzentrationen (Abb. 11) mit den weiblichen Tieren zeigten (Abb. 23).

Die Kortikosteronkonzentration im Plasma der acht Katzen während 24 h zeigte wie die Kortisolkonzentration keine signifikanten Unterschiede (Abb. 24). Sie wies im Vergleich zu Kortisol weniger Schwankungen auf. Zwei deutlich unterschiedliche Phasen wurden nicht gefunden, zudem verläuft sie auf einem niedrigeren Konzentrationsniveau als Kortisol (zwischen  $11,4 \pm 1,6$  nmol/l und  $21,7 \pm 4,9$  nmol/l). Auch in anderen Studien wurde gezeigt, dass Kortikosteron niedrigere Konzentrationen, sowohl im tageszeitlichen Verlauf (ALBERS et al. 1985, SZETO et al. 2004) als auch unter Stress (SZETO et al. 2004) aufweist. Die sehr viel geringere Konzentration von Kortikosteron könnte durch einen unterschiedlichen Wirkort oder auch einen unterschiedlichen Syntheseort als die NNR hervorgerufen werden. Hinweise darauf gibt die Studie von RAUBENHEIMER et al. (2006), die eine sehr viel höhere Kortikosteronkonzentration in der Gehirnflüssigkeit als im Plasma beim Menschen feststellte. Auch Untersuchungen der Kortikosteronaktivität im Rattengehirn zeigten, dass Kortikosteron eine entscheidende Rolle im negativen

Rückkopplungsmechanismus durch Besetzen der GK-Rezeptoren im Hypothalamus spielt (DE KLOET et al. 1998). In einer Studie von DAVIES und McKENZIE (2003) wurden alternative Synthesorte von GK wie Gehirn und Herz-Kreislaufsystem untersucht. Sie fanden Hinweise für eine extraadrenale Produktion, allerdings in quantitativ sehr geringen Mengen. In der eigenen Untersuchung erscheint eine Synthese von Kortikosteron im Gehirn ein möglicher alternativer Synthesort neben der NNR zu sein und würde einen Anhaltspunkt für die niedrige Konzentration im Plasma geben.

### 5.2.2 Hämatokrit

Bei Betrachtung des Hämatokritverlaufs scheint ein zeitversetzter, inverser Verlauf der Kortisolkonzentration erkennbar zu sein. So kann man sehen, dass es bei einem Anstieg der Kortisolkonzentration im Plasma (Abb. 23) zeitversetzt (2 h) zu einem Abfall des Hämatokrits gekommen ist (Abb. 26). Dies wäre durch die mineralokortikoide Wirkung von Kortisol denkbar. Dabei kommt es über Belegung der MK-Rezeptoren zu einer Abnahme der Natriumausscheidung über die Niere. Durch die erhöhte Natriumkonzentration in den Gefäßen wird gleichzeitig Wasser zurück gehalten, was wiederum zu einer relativen Abnahme der roten Blutkörperchen und damit zum Hämatokrit führt (AURICH 2002).

Eine Erklärung für die Verminderung des Hämatokrits nach 24 h (signifikante Unterschiede zwischen 12(1)/12(2) Uhr, Abb. 26) könnte der Erythrozytenverlust von 6-7 % durch die sich alle 2 h wiederholenden Blutentnahmen sein. Der Körper versucht vor dem Ausgleich der zellulären Bestandteile, das Volumen auszugleichen, so dass es zu einer „Verdünnung“ des Blutes kommt. Das Volumen wurde zudem durch die Spülungen nach der Blutentnahme mit der gleichen Menge NaCl-Heparinlösung wie Blut entnommen wurde, wieder aufgefüllt.

### 5.2.3 Periodizität

Es wurden Periodizitäten in allen drei Parametern (Kortisol, Kortikosteron und der Ratio) während 24 h gefunden. Die Katzen (Nr. 6549, Nr. 6565, Nr. 6567, Nr. 6568) hatten 6 bis 7 Peaks in den GK-Konzentrationen oder ihrer Ratio (Tab. 3). KEMPPAINEN und PETERSON (1996) dagegen fanden 2 bis 3 Peaks innerhalb 3 h, dabei lag die Blutentnahmefrequenz bei 20 min (KEMPPAINEN und PETERSON 1996). Daran ist zu sehen, dass mit der Häufigkeit der Blutentnahmen auch die Anzahl der gefundenen Peaks steigt. Eine derart hohe Blutentnahmefrequenz war in dieser Untersuchung nicht möglich. Dies sollte im Stressversuch mit den frequenten Blutentnahmen vor dem milden Stressor erfolgen, aber wegen der Reaktion vor der Dusche war dies dann nicht mehr sinnvoll. So ist es möglich, in der eigenen Untersuchung Peaks zwischen den alle 2 h stattfindenden Blutentnahmen nicht entdeckt zu haben. Es gilt die Aussage: je höher die Blutentnahmefrequenz ist, desto mehr Peaks werden gefunden (CARNES et al. 1986, KEMPPAINEN und PETERSON 1996). Dennoch ist in der Kortisolkonzentration im Plasma bei der Hälfte der Tiere (Nr. 2040: Abb. 29, Nr. 6549: Abb. 30, Nr. 6558: Abb. 31, Nr. 6567: 33), neben den 6-7 identifizierten Peaks (Tab. 3), ein zweiphasiger Verlauf (Peaks um 20 und 6 Uhr) zu erkennen, der jedoch nicht signifikant war. Um gesicherte Erkenntnisse zur Periodizität eines Tages zu erhalten, müssten die Daten über mehr als einen Tag erhoben werden (KRUSE und GOTTMAN 1982).

Dazu müsste im Versuchsaufbau bedacht werden, dass die Tiere in ihren täglichen Gewohnheiten (Ruhezeiten, Futteraufnahmezeiten, Spielverhalten) durch die Blutentnahmen nicht gestört werden. Implantierte Pumpensysteme würden eine solche Möglichkeit bieten. Diese entnehmen selbständig zu vorher eingestellten Uhrzeiten aus einem ebenfalls implantierten Katheter eine bestimmte, meist sehr geringe Menge Blut (IKEMOTO 2003). Auch ein System ähnlich wie dem sog. *free moving rat system* wäre theoretisch denkbar. Bei diesem System befindet sich das Ende eines intravenösen Katheters aufgrund einer Verlängerung außerhalb des Käfigs, so dass das Tier durch die Blutentnahme nicht beeinträchtigt wird (BASESKI et al. 2005). Wie praktikabel solche Systeme für die Anwendung bei der Katze wären, ist mehr als fraglich.

## 5.3 Ratio aus Kortisol und Kortikosteron als Stressparameter

### 5.3.1 Ratio aus Kortisol und Kortikosteron des Stressversuchs

Einige der Kater zeigten vor der Einwirkung des milden Stressors einen Anstieg der Kortisolkonzentration im Plasma (Nr. 2120: Abb. 15, 2128: Abb. 18, 6559: Abb. 19, 6564: Abb. 21). Dieser Anstieg war nicht gewollt, aber dennoch vorhanden. So ist zu vermuten, dass die Konzentration des Kortisols im Plasma aufgrund von Handling-bedingtem Stress der Tiere verursacht wurde. Dieser Anstieg war bei der statistischen Auswertung nicht signifikant (Abb. 11).

Im Verlauf der Ratio war dieser Anstieg ebenfalls zu sehen. Nach Analyse der Ratiowerte zeigte sich, dass die Werte dieses Anstiegs ( $t = 60$  bis  $t = 90$  min) zu den Werten vorher ( $t = 0$  min bis  $t = 45$  min) und nach dem milden Stressor ( $t = 100$  min bis  $t = 135$  min) signifikant unterschiedlich waren (Abb. 13). Auch am Ende des Stressversuchs wurden Vorteile der Ratio gegenüber Kortisol deutlich. Zum Zeitpunkt  $t = 180$  min war die Kortisolkonzentration nicht mehr signifikant unterschiedlich zu der Konzentration vor dem milden Stressor (Abb. 11). Bei der Ratio dagegen war der Wert der letzten Messung immer noch signifikant größer als die Werte vor der Dusche ( $t = 0$  min bis  $t = 60$  min; Abb. 13). Wenn die Ratio als Stressparameter herangezogen wird, ist dies ein Hinweis darauf, dass die Wirkung des milden Stressors auch noch nach 90 min vorhanden war.

SZETO et al. (2004) untersuchten Kortikosteron und Kortisol beim Kaninchen unter Stress und im tageszeitlichen Verlauf. Sie stellten fest, dass unter Stress beide GK mit steigenden Konzentrationen reagierten. Dabei verhielten sich Kortisol und Kortikosteron im Anstieg aber unterschiedlich zueinander (im Verlauf über die unterschiedlichen Tage), so dass auch hier mit einer veränderten Ratio aufgrund einer Stressreaktion zu rechnen gewesen wäre (die Ratio wurde durch die Autoren selber nicht berechnet; SZETO et al. 2004).

Dies lässt, zusammen mit den eigenen Ergebnissen, die These zu, dass die Ratio eine bessere Aussagekraft über die Dauer und Intensität einer Stressreaktion gibt als die alleinige Bestimmung der Kortisol- oder der Kortikosteronkonzentration im Plasma. Da die Ratio signifikante Unterschiede zum Verlauf der

Kortisolkonzentration zeigte, wird deutlich, dass diese durch Kortikosteron hervorgerufen wurden. Unter Einfluss eines Stressors ist jedoch eine erweiterte Wirkung von Kortikosteron nicht vorstellbar, da die Stressantwort durch die Reaktion von Kortisol bestimmt wird und damit eventuelle andere Wirkungen von Kortikosteron überlagert.

### **5.3.2 Ratio aus Kortisol und Kortikosteron des 24 h Profils**

Bei der statistischen Analyse der Ratio wurden im Gegensatz zu den beiden GK signifikante Unterschiede gefunden (Abb. 25). Dies deutet ähnlich wie beim Stressversuch daraufhin, dass die Ratio, auch unter basalen Bedingungen, besser zur Beurteilung des Verhaltens der GK-Hormone sein könnte.

In den eigenen Untersuchungen wurde keine Korrelation zwischen der Kortisol- und Kortikosteronkonzentration festgestellt (siehe Kapitel 4.4.1). Andere Autoren hingegen konnten eine derartige Korrelation der GK-Konzentrationen zeigen (ALBERS et al. 1985, SZETO et al. 2004). Im Falle einer Korrelation der beiden GK könnte man davon ausgehen, dass Kortisol und Kortikosteron unter Ruhebedingungen dem gleichen Regulationsmechanismus über eine Aktivierung der HPA-Achse unterliegen (siehe Kapitel 5.1.1). Da sich der Verlauf der Kortikosteronkonzentration im 24 h Profil deutlich vom Verlauf der Kortisolkonzentration unterschied, und beide GK nicht miteinander korrelierten, muss man davon ausgehen, dass die Kortikosteronkonzentration einem anderen Regulationsmechanismus unterliegt.

Durch nur geringe Änderungen im Verlauf der Kortikosteronkonzentration im 24 h Profil, ähnelt der Verlauf der Ratio sehr dem Verlauf der Kortisolkonzentration. Folgerichtig ließen sich beide Parameter miteinander korrelieren, während es zwischen der Ratio und der Kortikosteronkonzentration keinen Zusammenhang gab (siehe Kapitel 4.4.1). Im Gegensatz dazu konnten ALBERS et al. (1985) eine Korrelation der beiden GK mit der Ratio in einem tageszeitlichen Verlauf feststellen, allerdings wurden diese Untersuchungen am Hamster durchgeführt, welcher in beiden GK einen tageszeitlich-abhängige Ausschüttung von Kortisol und Kortikosteron aufwies.

Aus den dargestellten Fakten (unterschiedliche Regulation der beiden GK, Korrelation zwischen der Kortisolkonzentration und der Ratio) ergibt sich, dass Kortisol das dominante GK bei der Katze darstellt, wie auch schon von FELDMAN (1983) beschrieben. Allerdings bestehen im 24 h Profil und ebenso im Stresstest, statistische Vorteile in der Untersuchung der Ratio. Dies könnte durch die eigenständige Regulation der Kortikosteronkonzentration und des sich daraus ergebenden Verlaufs dieser Konzentration im 24 h Profil (Abb. 24) bedingt sein. Auf Grund der sehr individuellen Verläufe der Kortisolkonzentrationen der einzelnen Katzen im 24 h Profil, kann es daher von Interesse sein, durch Bestimmung der Ratio zwischen beiden GK weitere Informationen hinsichtlich der „Stressbelastung“ zu unterschiedlichen Tageszeiten zu erhalten.

Da sich die Kortikosteronkonzentration in den dargestellten Untersuchungen jeweils nur geringfügig änderte, die Ratio aus beiden GK aber statistische Vorteile zeigte, stellt sich die Frage, welche Vorteile Tiere wie die Katze aus dem Vorhandensein beider GK ziehen, und wie diese Vorteile selbst bei nur kleinen Änderungen in der Konzentration eines GK (Kortikosteron) genutzt werden können. Folgende Möglichkeiten kämen in Betracht:

1. eine unterschiedliche Wirkung von Kortisol und Kortikosteron am GK-Rezeptor oder MK-Rezeptor. Dies erscheint aber eher unwahrscheinlich, da hierzu bisher keine Studien veröffentlicht wurden. MCMASTER et al. (2008) fanden allerdings bei ihren Untersuchungen heraus, dass unterschiedliche Liganden-Konzentrationen den Umfang der GK-Antwort ändern können.
2. eine unterschiedliche Bindungsaffinität von Kortisol und Kortikosteron zwischen dem GK- und dem MK-Rezeptor. SUTANO et al. (1988) entdeckten beim Hamster unterschiedliche Bindungsaffinitäten von Kortisol und Kortikosteron an diese beiden Rezeptoren im Gehirn. Sie fanden heraus, dass der MK-Rezeptor, der hauptsächlich im Hippokampus des Hamsters zu finden ist, Kortisol und Kortikosteron mit einer ähnlichen Affinität bindet. Der GK-Rezeptor, der im ganzen Gehirn ubiquitär zu finden ist, zeigt dagegen eine vier- bis sechsfach höhere Bindungsaffinität zu Kortisol als zu Kortikosteron (SUTANO et al. 1988). Derartige

Untersuchungen bei der Katze wurden bisher in der Literatur nicht beschrieben.

3. eine unterschiedliche Affinität von Kortisol und Kortikosteron zu Transkortin (*corticosteroid-binding globulin*, CBG). Durch unterschiedliche Bindungsaffinitäten würde sich durch kleine Änderungen einer GK-Konzentration das Verhältnis freies Kortisol zu gebundenem Kortisol bzw. freies Kortikosteron zu gebundenem Kortikosteron ändern. Die Affinität von Kortisol zu CBG wird in einer Studie von ZAGER et al. (1986) für den Menschen mit einer Assoziationskonstante von  $30 \times 10^{-6}$  mol angegeben. Für die Katze wurde eine Bindungsaffinität von 30% von Kortisol an Serumproteine angegeben. Dabei hatte der Gerbil die höchste Bindungsaffinität von 75% und das Schwein mit unter 10% die niedrigste (FENSKE 1991). Beim Kaninchen nimmt die Affinität von Kortisol zu Kortikosteron hin ab (DANIEL et al. 1982). Sollte dies bei der Katze ähnlich sein, könnten geringe Änderungen der Kortikosteronkonzentration zu großen Änderungen beim freien Kortikosteron im Plasma führen.

Auf Grund der gewählten Methodik (Blutentnahme aus vorderer Hohlvene) und anderer gezeigten Ergebnisse (Geschlechterunterschied) muss aber darauf hingewiesen werden, dass die gefunden Ergebnisse bezüglich der Ratio und der Kortikosteronkonzentration spezifisch für diese Versuchsanordnung sind.

## 5.4 Geschlechterabhängigkeiten

Bisher gibt es in der Literatur keinen Anhaltspunkt für eine geschlechtsspezifische Abhängigkeit der Kortisolkonzentration (JOHNSTON und MATHER 1979, WILLEMSE et al. 1993, KEMPPAINEN und PETERSON 1996, JAVADI et al. 2004, CHATDARONG et al. 2006).

Um geschlechtliche Einflüsse bezüglich der GK-Konzentrationen während den Versuchen auszuschließen, wurde der Stressversuch mit männlichen und das 24 h Profil mit weiblichen Tieren durchgeführt. Schon während des ACTH-Stimulationstests zeigte sich, dass es Unterschiede in den GK-Konzentrationen zwischen männlichen und weiblichen Tieren gab.

Im ACTH-Stimulationstest gab es signifikante Unterschiede in der Kortisolkonzentration (Abb. 7) und in den Hämatokritwerten (Abb. 10) zwischen beiden Geschlechtern. Weiterhin ist zu sehen, dass die weiblichen Tiere eine sehr viel größere Varianz der Kortisol- und Kortikosteronkonzentration im Plasma aufwiesen als die Kater (Abb. 7 und 8). KEMPPAINEN und PETERSON (1996) verglichen Kortisolkonzentration von weiblichen und männlichen Tieren. Im zweiten Versuchsmodell ihrer Studie wurde fünf weiblichen und fünf männlichen Katzen während 48 h in 2-h-Intervallen Blut entnommen. Bei diesen Tieren fiel auf, dass auch hier die weiblichen Tiere eine größere Variation in der Kortisolkonzentration im Plasma aufwiesen (KEMPPAINEN und PETERSON 1996).

Um dies auch in den unterschiedlichen Versuchen (ACTH-Stimulationstest: Blutentnahme mittels Venenpunktion; Stressversuch und 24 h Profil: Blutentnahme mittels VAP-System) nachweisen zu können, wurden Messwerte gesucht, die in beiden Versuchen zur gleichen Uhrzeit genommen wurden. Weitere Bedingung war, dass zu diesem Zeitpunkt von Basalkonzentrationen ausgegangen werden konnte. So wurde bei den männlichen Tieren der Mittelwert aus den Messzeitpunkten  $t = 0$  min bis  $t = 45$  min gebildet. Dies entsprach dem Zeitraum von 11:00 bis 11:45 Uhr. Bei den weiblichen Tieren wurde der Mittelwert aus den Messungen um 10 und 12 Uhr gebildet. Dies entsprach bei beiden



Gruppen ungefähr dem Zeitraum um 11 Uhr und lag bei den Katern damit vor dem Stressor (Abb. 35).

Im Geschlechtervergleich zwischen den beiden Versuchen (Stressversuch und 24 h Profil) stellte sich ein deutlicher Unterschied in der Kortikosteronkonzentration und in der Ratio zwischen weiblichen und männlichen Tieren heraus (Abb. 35). So hatten die Kater deutlich höhere Kortikosteronkonzentrationen im Plasma, die sich fast im gleichen Bereich wie die Kortisolkonzentration im Plasma bewegte. In der Ratio dagegen zeigten die weiblichen Tiere die höheren Werte und eine größere Varianz als die Kater (Abb. 35). Damit war die Entscheidung, die beiden Versuche getrennt geschlechtlich durchzuführen, um die Einflussfaktoren zu minimieren, richtig gewesen. Eine Beeinflussung der Ergebnisse konnte durch den oben gezeigten geschlechtlichen Unterschied verhindert werden. Allerdings kann man nicht erwarten, dass die Ergebnisse des Stresstests bei weiblichen Tieren gleich ausgefallen wären. Und umgekehrt kann man die Ergebnisse des 24h Profils nicht auf Kater übertragen. Um weitere Erkenntnisse zu erhalten, ist ein Tausch der Versuche zwischen den Geschlechtern eine notwendige weiterführende Untersuchung.

## 5.5 Methode

### 5.5.1 Weitere Auffälligkeiten

Die Hämatokritwerte des ACTH-Stimulationstests (Abb. 10) beider Geschlechter lagen deutlich über den Hämatokritwerten des Stressversuchs (Abb. 14) und des 24 h Profils (Abb. 26). Ein Grund für diesen Unterschied könnte auch hier die Blutentnahmetechnik sein. Während des ACTH-Stimulationstests wurde Blut aus der Peripherie des Körpers (V. saphena medialis) entnommen, während bei den beiden Versuchen das Blut über das VAP-System und damit aus einer herznahen Vene entnommen wurde (V. cava cranialis).

Unterschiedliche Druckverhältnisse in den Kapillaren und den zentralen großen Blutgefäßen könnte eine Erhöhung des Hämatokrits hervorgerufen haben. Der kolloid-osmotische Druck ändert sich in den Kapillaren wenig. Der hydrostatische Druck dagegen unterliegt großen Schwankungen. So zeigen die effektiven Filtrationsdrucke am Anfang und am Ende der Kapillare, dass der Nettoflüssigkeitstransport aus der Kapillare heraus größer ist als der Rücktransport ins Gefäß. Dadurch wird das Volumen im Verhältnis zu den Proteinen im Blut kleiner und der Hämatokrit damit größer. Anschließend wird in den Venolen und Venen zum Herzen hin der hydrostatische Druck noch geringer, während der kolloidosmotische Druck weiterhin konstant bleibt. Infolgedessen diffundiert nun wieder Flüssigkeit aus dem Gewebe in die Venen zurück. Dies führt, nach der geringgradigen Erhöhung des Hämatokrits in den Kapillaren, wieder zu einer Erniedrigung desselben (VON ENGELHARDT 2004). Da die roten Blutkörperchen den größten Anteil am Hämatokrit ausmachen, würde der oben beschriebene Mechanismus eine geringgradige Erhöhung des Hämatokrits während des ACTH-Stimulationstests (Blutentnahme peripheres Gefäß) erklären, jedoch nicht den Unterschied der hier zwischen den Werten des ACTH-Stimulationstests (Abb. 10) und den Werten der Versuche (Blutentnahme über VAP-System aus herznaher Vene; Abb. 14 und Abb. 26) entstanden ist.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass es beim ACTH-Stimulationstest zu den gleichen Vorgängen gekommen sein könnte, wie beim Stresstest. Das Fangen von jedem Tier aus der Gruppe heraus, die anschließende Zwangsfixation und der

Punktionsschmerz während der Blutentnahme könnte eine zusätzliche Stressreaktion ausgelöst haben. Dadurch wäre es, wie beim Stresstest, zu einer sekundenschnellen Aktivierung des sympathischen Nervensystems und der damit verbundenen Katecholaminausschüttung im Rahmen einer stressassoziierten „*fight or flight*“ Reaktion. Dies hätte zum einen den Blutdruck erhöht. Daraufhin hätte ein Flüssigkeitsshift vom intravasalen in den extravasalen Raum stattgefunden und der Hämatokrit hätte sich erhöht (ALLEN und PATTERSON 1995).

Zum anderen wäre eine Ausschüttung der Erythrocytenspeicher in der Milz denkbar, hauptsächlich durch physischen Stress (Fangen, Zwangsfixation) ausgelöst. Auch dies hätte zu einer Hämatokriterhöhung (TVEDTEN 1981, BREZNOCK und STRACK 1982a und 1982b) geführt. Stress als Auslöser für die Erhöhung des Hämatokrits während des ACTH-Stimulationstests würde damit eine wahrscheinliche Ursache sein. Ein Vergleich der Werte des ACTH-Stimulationstests mit den Werten des Stressversuchs nach Einwirkung des milden Stressors verstärkt diese Annahme. Die Hämatokritwerte lagen 5 min nach der Dusche bei  $0,41 \pm 0,02$  l/l Blut (Abb. 14) und glichen damit den Werten des ACTH-Stimulationstests (12:30 Uhr, vor ACTH-Injektion: männliche Tiere:  $0,41 \pm 0,01$  l/l Blut, weibliche Tiere:  $0,42 \pm 0,01$  l/l Blut; Abb. 10).

Eine weitere auffällige Beobachtung war der Unterschied im Konzentrationsniveau von Kortikosteron zwischen dem ACTH-Stimulationstest (Abb. 8) und dem Stressversuch (Abb. 12) bei den männlichen Tieren. So waren die Konzentrationen während des ACTH-Stimulationstests niedriger als die basalen Konzentrationen (t = 0 min bis t = 90 min) des Stressversuchs. Beim ACTH-Stimulationstest wurde Blut mittels Venenpunktion aus der peripheren Vena saphena medialis genommen, während beim Stresstest das Blut aus der Vena cava cranialis via VAP-System entnommen wurde.

Eine Erklärung für unterschiedliche Kortikosteronkonzentrationen könnte, wie schon in Kapitel 5.2.1 erwähnt, ein von der NNR alternativer Syntheseort von Kortikosteron sein. Auch die unterschiedliche Verteilung der MK- und GK-Rezeptoren bei verschiedenen Tierarten im Gehirn gibt hierauf Hinweise (siehe

Kapitel 5.3.2). Aufgrund dessen könnte es zu einer anderen quantitativen Verteilung der Kortikosteronkonzentration im Blut kommen, was die unterschiedlichen Konzentrationen von Kortikosteron bei der Blutentnahme aus den verschiedenen Gefäßen erklären würde. Es muss aber deutlich hervor gehoben werden, dass diese Unterschiede in der Kortikosteronkonzentration und auch in der Ratio spezifisch für die Versuchseinstellung sind und deswegen nicht als allgemein gültig zu sehen sind.

### **5.5.2 Verhalten der Tiere während der Versuche**

Da es sich um Versuchskatzen handelte, wurden alle Tiere vorher an das gehalten werden auf dem Arm einer sitzenden Person und an die Blutentnahmen gewöhnt. Dennoch wurden verschiedene Reaktionen auf diese Positionierung der Katzen beobachtet.

Während des Stressversuchs verblieb ein Kater (Nr. 2127) während der gesamten 3 h auf dem Arm, andere Tiere waren unruhiger und wurden in längeren Entnahmepausen (10 min und 15 min Abstände) zurück in den Käfig gesetzt. Während des milden Stressors (Dusche) blieben Panikreaktionen aus.

Da die Entnahmeabstände während des 24 h Profils weit auseinander lagen und die Tiere nach jeder Entnahme zurück in ihren Käfig gesetzt wurden, waren die Tiere ruhig und entspannt. Abwehrreaktionen waren nicht zu beobachten. Eine Erhöhung der Kortisolkonzentrationen über physiologische Werte hinaus wurde nicht gemessen (Abb. 23). In der Literatur sind mit einer großen Spannweite unter den verschiedenen Autoren folgende Werte für die physiologische Kortisolkonzentration im Plasma der Katze angegeben: KRAFT und DÜRR (2005) nennen einen Referenzwert von 41 bis 138 nmol/l. SCHOEMAN et al. (2000) geben sogar Konzentrationen zwischen 81 und 354 nmol/l Plasma an (siehe auch Kapitel 2.4.2; Tab.1). Da versucht wurde die Tiere in ihren Gewohnheiten so wenig wie möglich zu stören, wurde Weißlicht als Lichtquelle nur minimal gebraucht, da die Versuche in einer Jahreszeit mit einem nahezu 12 h Tag/12 h Nacht-Rhythmus durchgeführt wurden. Somit sollte die Beeinflussung der Werte durch die Versuchsanordnung weitgehend minimiert worden sein.

## 5.6 Schlussfolgerung

Abschließend ist zu sagen, dass die Implantation des VAP-Systems bei der Katze erfolgreich war. Es gewährleistete in dieser Versuchsanordnung bei allen Tieren eine möglichst stressfreie Blutentnahme.

Das Verhalten der Kortisolkonzentration auf die Einwirkung des milden Stressors Dusche war wie es vor Versuchsbeginn erwartet wurde (Abb. 11). Kleinere Abweichungen wurden festgestellt, wie zum Beispiel der Anstieg vor dem milden Stressor. Es kam, wie erwartet, zu einem signifikanten Anstieg nach der Dusche und einem baldigen Abfall der Werte danach.

Kortikosteron hat im ACTH-Stimulationstest mit einem sehr langsamen Anstieg reagiert (Abb. 8). Beim Stressversuch hat die Kortikosteronkonzentration kaum eine Reaktion auf den milden Stressor gezeigt (Abb. 12). Eventuell hat der milde Stressor Dusche nicht ausgereicht, um eine ähnlich hohe Konzentration von Kortikosteron wie beim ACTH-Stimulationstest auszulösen. Es wäre zu untersuchen, wie sich die Kortikosteronkonzentration auf die Einwirkung eines starken oder chronischen Stressors verhält.

Im 24 h Profil verlief die Kortikosteronkonzentration relativ konstant, zeigte aber dennoch eine eigene Periodizität (Abb. 24). Daraus ergab sich die Frage nach einem anderen, von Kortisol unabhängigen Regulationsmechanismus. Gleichzeitig ist zu überlegen, welche andere Funktion Kortikosteron, neben der untergeordneten Funktion in der Stressantwort im Organismus hat. Diese Annahme wird verstärkt durch die Unterschiede in der Kortikosteronkonzentration zwischen dem ACTH-Stimulationstest (Abb. 8) und den basalen Werten des Stressversuchs ( $t = 0$  min bis  $t = 90$  min; Abb. 12), da in beiden Versuchen aus verschiedenen Gefäßen Blut entnommen wurde. Die Vermutung liegt nahe, aufgrund verschiedener Literaturangaben, dass diese unterschiedliche Funktion gleichzeitig durch einen anderen Bildungsort von Kortikosteron, wie z. Bsp. das Gehirn sein könnte.

Kortisol ist das Hauptglukokortikoid bei der Katze, das bei einer Stressreaktion signifikant ansteigt. Kortikosteron dagegen zeigt kaum eine Reaktion. Aus der berechneten Ratio der beiden GK ergeben sich durch die leichte Änderung im Vergleich zum Kortisolkonzentrationsverlauf, verursacht durch Kortikosteron, neue Erkenntnisse. Zum einen wurde durch die Ratio der erfolgte Anstieg vor dem milden Stressor „erkannt“. Zum anderen würde sich durch die Ratio nachweisen lassen, dass die Wirkung des milden Stressors nach 90 min noch nicht vollständig abgeklungen war. Aufgrund dieser Ergebnisse stellt die Ratio in dieser Versuchsanordnung, neben Kortisol, eine weitere Möglichkeit dar, eine Stressreaktion bei der Katze besser zu beurteilen.

Es stellte sich bei allen Tieren im 24 h Profil eine Periodizität heraus. Jedoch war diese individuell sehr unterschiedlich. Nur bei bloßer Betrachtung der Hälfte der Katzen (4) ist ein zweiphasiger Verlauf zu sehen. Dennoch waren durch die Berechnung der Ratio signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten zu finden (Abb. 25). Es wäre zu überprüfen, ob die sehr individuellen Unterschiede im 24 h Profil konstant über mehrere Tage gezeigt werden.

Die oben genannten Ergebnisse sind unter der Einschränkung zu betrachten, dass sie nur für die spezielle Versuchseinstellung dieser Untersuchung gelten.

## 6. Zusammenfassung

### **Bestimmung des Verhältnisses der Glukokortikoide Kortisol und Kortikosteron im Blut der Katze unter Ruhe- und Stressbedingungen**

Da heutzutage Katzen in der Tierarztpraxis eine immer größere Rolle spielen, wird eine bessere Stresserkennung dieser Tierart unumgänglich. Jeder Transport zum Tierarzt und die tierärztliche Untersuchung selbst verursachen Stress und können die hämatologischen und biochemischen Parameter des Blutes beeinflussen und damit Krankheitsbilder verschleiern. Auch hat die Zahl der adrenalen Erkrankungen bei der Katze in den letzten Jahren zugenommen und macht es notwendig, die Mechanismen von Glukokortikoiden (GK) und ihrer Regulation bei dieser Tierart besser zu verstehen. In der Verhaltenstherapie ist die Erkennung von einem Stressgeschehen bei der Katze für eine erfolgreiche Behandlung seiner Auswirkungen (Unsauberkeit und Aggressionen) essentieller geworden. In der Literatur sind viele Angaben und Studien zu Kortisol bei der Katze vorhanden, aber keine zu Kortikosteron, daher sollten das Verhalten der Kortisol- und Kortikosteronkonzentration im Plasma und ihre Ratio unter basalen Bedingungen, sowie unter Einwirkung eines milden Stressors, näher untersucht werden.

Um die Blutentnahmen so stressfrei wie möglich zu gestalten, wurde allen Tieren ein total implantiertes Kathetersystem (*venous access port*, VAP-System) eingesetzt. So mussten die Tiere während der Versuche auf dem Arm einer sitzenden Person verbleiben, damit aus der Portkammer an der linken Brustwand Blut entnommen werden konnte. Um eine physiologische Funktion der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren Achse (HPA-Achse) zu gewährleisten, wurden alle Tiere vor dem eigentlichen Versuchsbeginn einem adrenokortikotropines Hormon (ACTH)-Stimulationstest unterzogen. Der weitere Versuchsaufbau gliederte sich in zwei Gruppen. In der ersten Gruppe wurde acht Katzen in unterschiedlichen Zeitintervallen (5, 10, 15 min) 19-mal Blut entnommen. Neunzig Minuten nach Versuchsbeginn, (= zehnte Blutentnahme), wurden die Tiere einem Duschbad von 3 min unterzogen. In der zweiten Gruppe wurde acht weiblichen Tieren über 24 h alle 2 h Blut entnommen. In beiden Versuchen wurde nach jeder Blutentnahme der Hämatokrit bestimmt. Die GK-Konzentrationen im

Plasma wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) bestimmt, anschließend wurde die Ratio aus ihren Werten berechnet.

Die Ergebnisse des Stresstests zeigten einen Anstieg der Kortisolkonzentration nach dem milden Stressor Dusche. Die Kortikosteronkonzentration veränderte sich nicht. Die Ratio stieg ebenfalls nach dem Stressor an. Darüber hinaus zeigte sie aber mehr signifikante Unterschiede als die Auswertung der Kortisolraten. Der Hämatokrit reagierte mit einem schnellen Anstieg und Abfall auf die Dusche.

Im 24 h Profil gab es nur in der Ratio Unterschiede, die Konzentrationen von Kortisol und Kortikosteron im Plasma veränderten sich nicht, obwohl die Kortisolkonzentration größeren Schwankungen unterlag. Der Hämatokrit sank über 24 h. Kortisol und Kortikosteron korrelierten nicht miteinander, Kortisol korrelierte aber mit der Ratio.

Die Untersuchungen (ACTH-Stimulationstest, Stressversuch, 24 h Profil) zeigten geschlechtsspezifische Unterschiede in allen untersuchten Parametern (Kortisol, Kortikosteron, Ratio und Hämatokrit).

Kortikosteron reagierte im ACTH-Stimulationstest stärker auf den Stressor (ACTH) als beim Stressversuch und hatte insgesamt höhere Konzentrationen im Plasma. Im 24 h Profil wies es weniger Schwankungen auf als Kortisol, zeigte aber eine unabhängige Periodizität.

Durch die unterschiedliche Reaktion von Kortikosteron in den Versuchen (ACTH-Stimulationstest, Stressversuch, 24 h Profil) wird deutlich, dass Kortikosteron in der Stressreaktion nur eine Nebenrolle spielt und eventuell eine weitere, andere Funktion dieses GK denkbar wäre. Bei Betrachtung der Daten der Einzeltiere, erkennt man eine signifikante Reaktion von Kortisol auf den milden Stressor. Dennoch ließen sich aus der Berechnung der Ratio der beiden GK Erkenntnisse gewinnen, die durch die Beurteilung der Kortisolkonzentration alleine nicht gefunden wurden. Dies war auch im 24 h Profil der Fall. In dieser Versuchsanordnung stellt die Ratio eine weitere Möglichkeit dar, die Beurteilung



einer Stressreaktion und des tageszeitlichen Verlaufs der GK-Ausschüttung bei der Katze durch mehr als nur einen Parameter (Kortisol) betrachten zu können. Ein tageszeitlicher Rhythmus konnte bei der Katze nicht festgestellt werden, allerdings sind deutliche Schwankungen der GK-Konzentration innerhalb eines Tages vorhanden.

## 7. Summary

### **Determination of rhythmicity and the ratio of the glucocorticoids cortisol and corticosterone in the blood of cats under rest and under a stressful condition.**

Today, the importance of cats in the veterinary practice grows evidentially. This makes it necessary to diagnose Stress in a better way than it is done until now. Every transport to the veterinarian and every clinical examination are stressful for a cat. These circumstances are able to change the haematological and biochemical parameters and therefore mask the real clinical picture. The number of cases of adrenal disorders in cats increased in the last years as well. Hence it is essential to understand the mechanisms of glucocorticoids and their regulation in this species. The diagnosis of stress in the cat is also very helpful in behaviour therapy and treatment. Many studies were published about cortisol in the cat, but almost none were available of the role of corticosterone, therefore the behaviour of the cortisol and corticosterone concentrations in the plasma and their ratio are examined. All three parameters are assessed under rest conditions and under the exposure to a mild stressor.

To arrange an unbiased, stress-free blood collection, every cat underwent surgery for implantation of the venous access port system in the left jugular vein. During the trial period, the cat was held by a sitting person and blood could be collected from the port chamber on the left chest wall. Before the actual trial, to evaluate a physiological function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA-axis), every cat had to undergo an adrenocorticotropin hormone (ACTH) stimulation test. For the trials, the animals were divided into two groups: in the first group, eight male cats underwent 19 blood collections in different time intervals (5, 10 and 15 min). Ninety min after the first blood sampling (10<sup>th</sup> collection), every cat was showered for 3 min. In the second group, eight female cats underwent blood collection during 24 hours with 2 h time intervals. In both trials, after every blood sampling the packed cell volume (PCV, hematocrit) was measured. The concentrations of glucocorticoids in the plasma were determined by high performance liquid chromatography (HPLC), afterwards the ratio was calculated.

In the results of the stress trial an increase in the concentration of cortisol following the mild stressor can be observed. In contrast, corticosterone concentration did not change. Interestingly, the ratio increased significantly 45 min before the shower and when the shower was performed. Furthermore, the analysis of the ratio resulted in more significant differences than the analysis of the cortisol concentration. The PCV increased quickly after the stress and then declined again.

In the 24 h trial, only the ratio changed significantly. The concentrations of cortisol and corticosterone in the plasma showed no significant changes, although the cortisol concentration showed more variability. Cortisol and corticosterone were determined to be uncorrelated, but cortisol did correlate with the ratio. The PCV declined during 24 h.

The data analysis (ACTH stimulation test, stress trial, 24 h trial) displayed gender-related differences in all analysed parameters (cortisol, corticosterone, ratio, hematocrit).

Corticosterone presented a stronger reaction to the stressor (ACTH) in the ACTH stimulation test than in the stress trial and showed higher concentrations. In the 24 h trial, corticosterone appeared with less variability than cortisol, but with a independent periodicity.

Because of the different behavior of corticosterone in the trials (ACTH stimulation test, stress trial, 24 h trial) it becomes apparent, that corticosterone plays a minor role in an acute stress reaction. Hence another function could be possible for this glucocorticoid. Cortisol is the main actor in the stress reaction in the cat. By calculating the ratio of cortisol and corticosterone it was possible to gain new findings, which were not detected by analysing the concentration of cortisol alone. This was again the case in the 24 h trial. In this particular trial arrangement, the ratio of both glucocorticoids outlines another possibility for evaluating the stress response and the secretion rhythmicity during 24 h in the cat instead of analysing one single parameter (cortisol). Rhythmicity within a 24 h interval was not detected, but obvious fluctuations during 24 hours were observed.



## 8. Literaturverzeichnis

**ACCORSI PA, CARLONI E, VALSECCHI P, VIGGIANI R, GAMBERONI M, TAMANINI C, SEREN E (2008):**

Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs.  
Gen Comp Endocrinol 155:398-402.

**AHRENS F, SCHNEIDER M, KÖHLER F, ERHARD MH (2004):**

Salivary cortisol level in rescue dogs correlates with plasma cortisol only after physical stress.  
Pflugers Arch 447:S155.

**ALBERS F, YOGEV L, TODD RB, GOLDMAN BD (1985):**

Adrenal corticoids in hamsters: role in circadian timing.  
Am J Physiol 248:434-438.

**ALLEN MT und PATTERSON SM (1995):**

Hemoconcentration and stress: a review of physiological mechanisms and relevances for cardiovascular disease risk.  
Biol Psychol 41:1-27.

**ALLEN-ROWLANDS CF, ALLEN JP, GREER MA, WILSON M (1980):**

Circadian rhythmicity of ACTH and corticosterone in the rat.  
J Endocrinol Invest 4:371-377.

**AURICH J (2002):**

Endokrinpharmakologie.

In: FREY H-H und LÖSCHER W. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Enke Verlag, Stuttgart, 280-317. ISBN 978-3-8304-1070-6.

**BAILIE MB, WIXSON SK und LANDI MS (1986):**

Vascular-access-port implantation for serial blood sampling in conscious swine.  
Lab Anim Sci 36:431-433.

**BALLARINI C, INTRA M, PISANI CERETTI A, CORDOVANA A, PAGANI M, FARINA G, PERRONE S, TOMIROTTI M, SCANNI A, SPINA GP (1999):**

Complications of subcutaneous infusion port in the general oncology population.  
Oncology 56:97-102.

**BASESKI HM, WATSON CJ, CELLAR NA, SHACKMAN JG, KENNEDY RT (2005):**

Capillary liquid chromatography with MS3 for the determination of enkephalins in microdialysis samples from the striatum of anesthetized and freely-moving rats.  
J Mass Spectrom 40:146-53.

**BENECKE N (1994):**

Der Mensch und seine Haustiere.

Konrad Theiss Verlag, Stuttgart. ISBN 3806211051.

**BÖCK P und LIEBICH H-G (1999):**

Endokrines System (Systema endocrinum).

In: Liebich H-G. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Schattauer Verlag, Stuttgart, 157-175. ISBN 3-7945-1899-3.

**BOONSTRA R und TINNIKOV AA (1998):**

Increased corticosteroid binding capacity of plasma albumin but not of corticosteroid-binding globulin caused by ACTH-induced changes in free fatty acid concentrations in snowshoe hares and rabbits.

J Endocrinol 156:205-212.

**BREZNOCK EM und STRACK D (1982a):**

Blood volume of non splenectomized and splenectomized cats before and after acute hemorrhage.

Am J Vet Res 43:1811-1814.

**BREZNOCK EM und STRACK D (1982b):**

Effects of the spleen, epinephrine and splenectomy on determination of blood volume in cats.

Am J Vet Res 43:2062-2066.

**BURNSTEIN KL und CIDLOWSKI JA (1989):**

Regulation of gene expression by glucocorticoids.

Annu Rev Physiol 51:683-699.

**BUSH IE (1953):**

Species differences in adrenocortical secretion.

J Endocrinol 9:95-100.

**CAHALANE AK, RASSNICK KM und FLANDERS JA (2007):**

Use of vascular access ports in femoral veins of dogs and cats with cancer.

J Am Vet Med Assoc 231:1354-1360.

**CARLSTEAD K, BROWN JL und STRAWN W (1993):**

Behavioral and physiological correlates of stress in laboratory cats.

Appl Anim Behav Sci 38:143-158.

**CARNES M, BRWONFIELD MS, KALIN NH, LENT S, BARKSDALE CM (1986):**

Episodic secretion of ACTH in rats.

Peptides 7:219-223.

**CHARMANDARI E, TSIGOS C und CHROUSOS G (2005):**

Endocrinology of the stress response.  
Annu Rev Physiol 67:259-84.

**CHATDARONG K, PONGLOWHAPHAN S, KARLSSON A, LINDE-FORSBERG C (2006):**

The effect of ACTH stimulation on cortisol and progesterone concentrations in intact and ovariectomized domestic cats.  
Theriogenology 66:1482-7.

**CONLEY AJ und BIRD IM (1997):**

The role of cytochrome P450 17 $\alpha$ -Hydroxylase und 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the  $\Delta$ 5 and  $\Delta$ 4 pathways of steroidogenesis in mammals.  
Biol Reprod 56:789-799.

**COULTER CL und JAFFE RB (1998):**

Functional maturation of the primate fetal adrenal in vivo: 3. specific zonal localization and development regulation of CYP21A2 (P450 c21) and CYP11B1/CYP11B2 (P450c11/Aldosterone Synthase) lead to integrated concept of zonal and temporal steroid biosynthesis.  
Endocrinology 139:5144-5150.

**DANIEL JY, LEBOULENGER F, VAUDRY H, FLOCH HH, ASSENMACHER I (1982):**

Interrelations between binding affinity and metabolic clearance rate for the main corticosteroids in the rabbit.  
J Steroid Biochem 16:379-384.

**DANTZER R und MORMEDE P (1985):**

Stress in domestic animals: a psychoneuroendocrine approach.  
In: Moberg GP. Animal stress. Waverly Press, Inc. Baltimore, 81-95. ISBN: 0-683-06101-1.

**DAVIES E und MAC KENZIE SM (2003):**

Extra-adrenal production of corticosteroids.  
Clin Exp Pharmacol Physiol 30:437-445.

**DE KLOET ER, VREUGDENHIL E, OITZL MS, JOËLS M (1998):**

Brain corticosteroid receptor balance in health and disease.  
Endocr Rev 19:269-301.

**DRISCOLL CA, MENOTTI-RAYMOND M, ROCA AL, HUPE K, JOHNSON WE, GEFFEN E, HARLEY EH, DELIBES M, PONTIER D, KITCHENER AC, YAMAGUCHI N, O'BRIEN SJ, MACDONALD DW (2007):**

The near eastern origin of cat domestication.  
Science 317:519-523.

**EHRHART-BORNSTEIN M, HINSON JP, BORNSTEIN S, SCHERBAUM WA, VINSON GP (1998):**

Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis.  
Endocr Rev 19:101-143.

**ENGLER D, REDEI E und KOLA I (1999):**

The corticotropin-release inhibitory factor hypothesis: a review of the evidence for the existence of inhibitory as well as stimulatory hypophysiotropic regulation of adrenocorticotropin secretion and biosynthesis.  
Endocr Rev 20:460-500.

**FARDELLA CE und MILLER WL (1996):**

Molecular biology of mineralocorticoid metabolism.  
Annu Rev Nutr 16:443-470.

**FELDMAN EC (1983):**

The adrenal cortex.  
In: Ettinger SJ (eds.). Textbook of veterinary internal medicine. W.B. Saunders, Philadelphia, 1650. ISBN 1416001107.

**FILE SE, ZANGROSSI H, SANDERS FL, MARBUTT PS (1993):**

Dissociation between behavioral and corticosterone responses and repeated exposures to cat odor.  
Physiol Behav 54:1109-1111.

**FENSKE M (1991):**

Protein binding of cortisol by means of competitive adsorption: application to cortisol binding by serum of sixteen eutherian mammals.  
Comp Biochem Physiol 98A:61-66.

**FRANK J und GRIFFIN T (1989):**

Stress and immunity: a unifying concept.  
Vet Immunol Immunopathol 20:163-312.

**FREWEIN J (1994):**

Endokrine Drüsen.  
In: Frewein J und Vollmerhaus B (Hrgs.). Anatomie von Hund und Katze. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, 440-448. ISBN 3-8263-3001-3.

**FULKERSON WJ und TANG BY (1979):**

Ultradian and circadian rhythms in the plasma concentration of cortisol in sheep.  
J Endocrinol 81:135-141.

**GENARO G, MORAES W, SILVA JC, ADANIA CH, FRANCI CR (2007):**

Plasma hormones in neotropical and domestic cats undergoing routine manipulations.  
Res Vet Sci 82:263-70.



**GOOSSENS MMC, MEYER HP, VOORHOUT G, SPRANG EPM (1995):**  
Urinary excretion of glucocorticoids in the diagnosis of hyperadrenocorticism in cats.

Dom Anim Endocrinol 12:355-362.

**GRAHAM ML, RIEKE EF, WIJKSTROM M, DUNNING M, AASHEIM TC, GRACZYK MJ, PILON KJ, HERING BJ (2008):**

Risk factors associated with surgical site infection and the development of short-term complications in macaques undergoing indwelling vascular access port placement.

J Med Primatol 37:202-209.

**GRAHAM LH und BROWN JL (1996):**

Cortisol metabolism in the domestic cat and implications for non-invasive monitoring of adrenocortical function in endangered felids.

Zoo Biol 15:71-82.

**GREWING M (2004):**

Auswirkungen des Opioids Fentanyl auf die neuronale Aktivität visueller Strukturen der Katze und den Serumcortisol-Spiegel unter Allgemeinanästhesie.

Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.

**GRIFFITH CA, STEIGERWALD ES und BUFFINGTON CAT (2000):**

Effects of a synthetic facial pheromone on behaviour of cats.

J Am Vet Med Assoc 217:1154-1156.

**GRZIMEK B (1979):**

Kleinkatzen und Nebelparder.

Grzimeks Tierleben, Enzyklopädie des Tierreichs in 13 Bänden, Bd. 12, Säugetiere 3. Weltbild Verlag Augsburg, unveränderter Nachdruck 2002 von dtv Ausgabe 1979/80. ISBN 3-8289-1603-1.

**GUNN-MORE DA und CAMERON ME (2004):**

A pilot study using synthetic feline facial pheromone for the management of feline idiopathic cystitis.

J feline Med Surg 6:133-138.

**HANUKOGLU I (1992):**

Steroidogenic enzymes: structure, function and role in regulation of steroid hormone biosynthesis.

J Steroid Biochem Molec Biol 43:779-804.

**HENRY CJ, RUSSELL LE, TYLER JW, BUSS MS, SEGUIN B, CAMBRIDGE AJ, MOORE ME (2002):**

Comparison of hematologic and biochemical values for blood samples obtained via jugular venipuncture and via vascular access ports in cats.

J Am Vet Med Assoc 220:482-485.

**HORROCKS PM, JONES AF, RATCLIFFE WA, HOLDER G, WHITE A, HOLDER R, RATCLIFFE JG, LONDON DR (1990):**

Patterns of ACTH and cortisol pulsatility over twenty-four hours in normal males and females.

Clin Endocrinol 32:127-134.

**HUNTHAUSEN W (1999):**

Advances in feline behavior.

Proceedings of the 23rd WALTHAM/OSU Symposium, Columbus/Ohio: 37-41.

**IKEMOTO S (2003):**

Intermittent microinjection method in freely-moving rats and its application to neuropharmacology.

Nippon Yakurigaku Zasshi 121:264-7.

**IKI T (2005):**

Zur Struktur und Funktion der Nebennieren bei den Haussäugetieren. Eine Literaturstudie.

LMU München, vet med Fak, Diss.

**ILETT KF und LOCKETT MF (1969):**

Effect of age on the secretion of hydrocortisone and corticosterone into the adrenal venous blood of cats.

J Endocrinol 43:313-314.

**IRVINE CHG und ALEXANDER SL (1994):**

Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse.

Dom Anim Edocrinol 11:227-238.

**ISCHIMURA K und FUJITA H (1997):**

Light and electron microscopic immunohistochemistry of the localization of adrenal steroidogenic enzymes.

Microsc Res Tech 36:445-453.

**JAVADI S, SLINGERLAND LI, VAN DE BEEK MG, BOER P, BOER WH, MOL JA, RIJNBEEK A, KOOISTRA HS (2004):**

Plasma renin activity and plasma concentrations of aldosterone, cortisol, adrenocorticotrophic hormone, and alpha-melanocyte-stimulating hormone in healthy cats.

J Vet Intern Med 18:625-31.

**JOHNSTON SD und MATHER EC (1979):**

Feline plasma cortisol (hydrocortisone) measured by radioimmunoassay.

Am J Vet Res 40:190-192.

**KEMPPAINEN RJ und PETERSON ME (1996):**

Domestic cats show episodic variation on plasma concentrations of adrenocorticotropin, alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH), cortisol and thyroxine with circadian variation in plasma alpha-MSH concentrations. Eur J Endocrinol 134:602-609.

**KEMPPAINEN RJ und BEREND EN (1997):**

Glucocorticoid therapy: Pharmacology, Indications and Complications. Small Anim Pract 27:187-213.

**KOCK H-J, PIETSCH M, KRAUSE U, WILKE H, EIGLER FW (1999):**

Implantable vascular access systems: experience in 1500 patients with totally implanted central venous port systems. World J Surg 22:12-16.

**KOIJAMA K, MAKI S, HIRATA K, HIGUCHI S, AKAZAWA K, TASHIRO N (1995):**

Relation of emotional behaviors to urine catecholamines and cortisol. Physiol Behav 57:445-449.

**KOJIMA K, MOHAMED S, FUJIMARU Y, MORI Y, KANAME H, SUMIDA Y, KINUKAWA N, TASHIDO N (2000):**

Effects of both the emotional behaviour and feeling conditions on the circulating plasma volume and plasma glucose levels in cats. Auton Neurosci 86:58-64.

**KÖNIG HE und LIEBICH H-G (1999):**

Endokrine Drüsen (Glandulae endocrinae).

In: König HE, Liebich H-G. Anatomie der Haussäugetiere. Organe, Kreislauf und Nervensystem. Schattauer Verlag, Stuttgart, 277-286. ISBN 3-7945-2154-4.

**KRAFT W (2004):**

Vergleich zweier Bestimmungsmethoden für Schilddrüsenhormone, Kortisol und Insulin bei der Katze.

Tierärztl Prax 32:253-257.

**KRAFT W. und DÜRR UM (2005):**

Hämatologie und klinische Endokrinologie

In: Kraft W und Dürr UM. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. Schattauer Verlag, Stuttgart, 49-86 und 297-322. ISBN: 3-7945-2308-3.

**KRIEGER DT, SILVERBERG AI, RIZZO F, KRIEGER HP (1968):**

Abolition of circadian periodicity of plasma 17-ohcs levels in the cat.

Am J Physiol 215:959-967.

**KRUSE JA und GOTTMAN JM (1982):**

Time series methodology in the study of sexual hormonal and behavioral cycles.  
Arch Sex Behav 11:405-415.

**LADEWIG J (1994):**

Stress.

In: Döcke F (Hrsg.). Veterinärmedizinische Endokrinologie. Gustav Fischer Verlag, Jena und Stuttgart, 379-398. ISBN 3-334-60432-2.

**LAZARUS RS (1974):**

Psychological stress and coping in adaptation and illness.  
Int J Psychiatry Med 5:321-333.

**LEVINE ED (2008):**

Feline fear and anxiety.

Vet Clin Small Anim 38:1065-1079.

**LEYVA H, ADDIEGO L und STABENFELDT G (1984):**

The effect of different photoperiods of plasma concentrations of melatonin, prolactin and cortisol in the domestic cat.  
Endocrinology 115:1729-1736.

**LIGHTMAN SL (2008):**

The neuroendocrinology of stress: a never ending story.  
J Neuroendocrinol 20:880-884.

**LI LA, XIA D, WEI S, HARTUNG J, ZHAO RQ (2008):**

Characterization of adrenal ACTH signaling pathway and steroidogenic enzymes in Erhualian and Pietrain pigs with different plasma cortisol levels.  
Steroids 73:806-14.

**LING S und JAMALI F (2003):**

Effect of cannulation surgery and restraint stress on the plasma corticosterone concentration in the rat: application of an improved corticosterone HPLC assay.  
J Pharm Sci 6:246-251.

**LIPINSKY MJ, FROENICKE L, BAYSAC KC, BILLINGS C, LEUTENBERGER CM, LEVY AM, LONGERI M, NIINI T, OZPINAR H, SLATER MR, PEDERSON NC, LYONS LA (2007):**

The ascent of cat breeds: Genetic evaluations of breeds and worldwide random-bred populations.  
Genomics 91:12-21.

**LOWE AD, CAMPBELL KL und GRAVES T (2008):**

Glucocorticoids in the cat.  
Vet Dermatol 19:340-347.

**MARTIN LG, BEHREND EN, MEALEY KL, CARPENTER DM, HICKEY KC (2007):**

Effect of low doses of cosyntropin on serum cortisol concentrations in clinically normal dogs.

Am J Vet Res 68:555-560.

**MASON JW (1968):**

“Over-all” hormonal balance as a key to endocrine organization.

Psychosom Med 30:791-808.

**McCOBB EC, PATRONEK GJ, MARDER A, DINNAGE JD, STONE MS (2005):**

Assessment of stress levels among cats in four animal shelters.

J Am Vet Med Assoc 4:548-555.

**MOON PF (1997):**

Cortisol suppression in cats after induction of anesthesia with etomidate, compared with ketamine-diazepam combination.

Am J Vet Res 58:868-871.

**MORRISON JA, LAUER SK, BALDWIN CJ, EVANS RB, ANDREASEN CB, KINYON JM, SWANSON E (2007):**

Evaluation of the use of subcutaneous implantable vascular access ports in feline blood donors.

J Am Vet Med Assoc 230:855-861.

**MURRAY SA, DAVIS K und GAY V (2003):**

ACTH and adrenocortical gap junctions.

Microsc Res Tech 61:240-246.

**NICKEL R, SCHUMMER A und SEIFERLE E (1992):**

Nebenniere, Glandula suprarenalis.

In: Lehrbuch der Anatomie der Haussäugetiere Band IV Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 491-496. ISBN 3-489-58216-0.

**NIEDERHUBER JE, ENSMINGER W, GYVES JW, LIEPMAN M, DOAN K, COZZI E (1982):**

Totally implanted venous and arterial access system to replace external catheters in cancer treatment.

Surgery 92:706-712.

**NISHIDA S, MATSUMURA S, HORINO M, OYAMA H, TENKU A (1977):**

The variations of plasma corticosterone/cortisol ratios following ACTH stimulation or dexamethasone administration in normal men.

J Clin Endocrinol Metab 45:585-8.

**ÖSTERLUND I, HOLST H und MAGNUSSON U (1998):**

Hormonal and immunological changes in blood and mammary secretion in the sow at parturition.

Theriogenology 50:465-477.

**ORTH DN und KOVACS WJ (1998):**

The adrenal gland.

In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR. Williams textbook of endocrinology 9<sup>th</sup> Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, ISBN 0-7216-6152-1.

**PERRY-CLARK LM und MEUNIER LD (1991):**

Vascular access ports for chronic serial infusion and blood sampling in New Zealand white rabbits.

Lab Anim Sci 41:495-497.

**PETERSON ME, KEMPPAINEN RJ und ORTH DN (1994):**

Plasma concentrations of immunoreactive proopiomelanocortin peptides and cortisol in clinically normal cats.

Am J Vet Res 55:295-300.

**PIPPAL JB und FULLER PJ (2008):**

Structure-function relationships in the mineralocorticoid receptor.

J Mol Endocrinol 41:405-413.

**PRENTICE FD und WOOD JG (1975):**

Adrenergic innervation of cat adrenal medulla.

Anat Rec 181:689-703.

**RAND JS, KINNARD E, BAGLIONI A, BLACKSHAW J, PRIEST J (2002):**

Acute stress hyperglycaemia in cats is associated with struggling and increased concentrations of lactate and norepinephrine.

J Vet Intern Med 16:123-132.

**RAUBENHEIMER PJ, YOUNG EA, ANDREW R, SECKL JR (2006):**

The role of corticosterone in human hypothalamic-pituitary-adrenal axis feedback.

Clin Endocrinol 65:22-6.

**ROSENTHAL KL, PETERSON ME, QUESENBERRY KE, LOTHROP CD (1993):**

Evaluation of plasma cortisol and corticosterone responses to synthetic adrenocorticotrophic hormone administration in ferrets.

Am J Vet Res 54:29-31.

**SALAS MA, LEVELL MJ, EVANS SW, WHICHER JT (1989):**

Interleukin-6 and ACTH act synergistically to stimulate the release of corticosterone from adrenal gland cells.

Clin Exp Immunol 79:470-473.

**SANDS D (2007):**

Katzen. 500 Fragen und Antworten.  
Weltbild Verlag, Salzburg. 7-28, ISBN 3828917593.

**SCHATZ S und PALME R (2001):**

Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: a non-invasive  
Method for evaluating adrenocortical function.  
Vet Res Commun 25:271-287.

**SCHINNER S und BORNSTEIN SR (2005):**

Cortical chromaffin cell interaction in the adrenal gland.  
Endocr Path 16:91-98.

**SCHOEMAN JP, EVANS HJ, CHILDS D, HERRITAGE ME (2000):**

Cortisol response to two different doses of intravenous synthetic ACTH  
(tertacosctrin) in overweight cats.  
J Small Anim Pract 41:552-557.

**SCHWARZE E (1941):**

Von den Nebennieren.  
In: VII. Beitrag zur "Anatomie für den Tierarzt" Deutsche Tierärztl Wochenschrift  
49:601-609.

**SCOTT DW, KIRK RW und BENTINCK-SMITH J (1978):**

Some effects of short-term methylprednisolone therapy in normal cats.  
Cornell Vet 69:104-115.

**SERPELL JA (1988):**

Domestication and history of the cat.  
In: Turner D und Bateson P. The domestic cat. The biology of its behaviour.  
Cambridge University Press, Cambridge und New York, 183-191.  
ISBN 3275004311.

**SIMPSON ER und WATERMAN MR (1988):**

Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenocortical cells by  
ACTH.  
Ann Rev Physiol 50:427-440.

**SINOWATZ F (2008):**

Nervensystem.  
In: Rüsse I und Sinowatz F. Embryologie der Haustiere. Hohnholt GmbH, Bremen,  
ISBN 978-3-00-025267-9.

**SMITH JD, ALLEN SW, QUANDT JE und TACKETT RL (1996):**

Indicators of postoperative pain in cats and correlation with clinical criteria.  
Am J Vet Res 57:1674-8.

**SMITH JD, ALLEN SW und QUANDT JE (1999):**

Changes in cortisol concentrations in response to stress and postoperative pain in client-owned cats and correlation with objective clinical variables.  
Am J Vet Res 60:432-436.

**STEWART IB und McKENZIE DC (2002):**

The human spleen during physiological stress.  
Sports Med 32:361-369.

**STOCCO DM (2001):**

StAR Protein and the regulation of steroid hormone synthesis.  
Annu Rev Physiol 63:193-213.

**SUTANO W, REUL JM, VAN EEKELEN JA, DE KLOET ER (1988):**

Corticosteroid receptor analyses in rat and hamster brains reveal species specificity in the type I and II receptors.  
J Steroid Biochem (30):417-420.

**SZETO A, GONZALES JA, SPITZER SB, LEVINE JE, ZAIAS J, SAAB PG, SCHNEIDERMAN N, McCABE PM (2004):**

Circulating levels of glucocorticoid hormones in WHHL and NZW rabbits: circadian cycle and response to repeated social encounter.  
Psychoneuroendocrinol 29:861-6.

**TESCHE S, SAGOWSKI C, ZYWIETZ F, JENICKE L, BOHUSLAVIZKI KH, METTERNICH FU (2002):**

Multiple application of drugs in rats – a new port system.  
Oncology 25:178-180.

**THUN R und SCHWARTZ-PORSCHKE D (1994):**

Nebennierenrinde.

In: Döcke F. Veterinärmedizinische Endokrinologie. Gustav Fischer Verlag, Jena und Stuttgart. 309-353. ISBN 3-334-604322.

**THUN R, EGGENBERGER E, ZEROBIN K, LÜSCHER T, VETTER W, (1981):**

Twenty-four-hour secretory pattern of cortisol in the bull: evidence of episodic secretion and circadian rhythm.  
Endocrinology 109:2208-2212.

**TVEDTEN HW (1981):**

Hematology of the normal dog and cat.

Vet Clin North Am Small Anim Pract 11:209-217.

**VAN MOURIK S, STELMASIAK T und OUTCH KH (1985):**

Changes in plasma levels of cortisol and corticosterone after acute ACTH stimulation in rusa deer (*Cervus rusa timorensis*).  
Comp Biochem Physiol A Comp Physiol 81:545-9.



**VELDHUIS JD, KEENAN DM, PINCUS SM (2008).**

Motivations and methods for analyzing pulsatile hormone secretion.  
Endocr Rev. 29(7):823-64.

**VENKATASESHU GK und ESTERGREEN VL (1969):**

Cortisol and corticosterone in bovine plasma and the effect of adrenocorticotropin.  
J Dairy Sci 53:480-483.

**VON ENGELHARDT W (2004):**

Kreislauf.

In: Von Engelhardt W und Breves G (Hrsg.). Physiologie der Haustiere. 2. Auflage.  
Enke Verlag, Stuttgart. 171-192. ISBN 3-8304-1039-5.

**WEBB AI, BLISS JM und HERBST LH (1995):**

Use of vascular access ports in the cat.  
Lab Anim Sci 45: 110-114.

**WESTROPP JL, KASS PH und BUFFINGTON CAT (2006):**

Evaluation of the effects of stress in cats with idiopathic cystitis.  
Am J Vet Res 67:731-736.

**WILLARD MD und TVEDTEN H (2006):**

Endokrine und metabolische Störungen.

In: Willard MD und Tvedten H. Labordiagnostik in der Kleintierpraxis. Urban &  
Fischer Verlag. 201-254. ISBN 3-437-57080-3.

**WILLEMSE T, VROOM MW, MOL JA, RIJNBERK A (1993):**

Changes in plasma cortisol, corticotrophin and  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone concentrations in cats before and after physical restraint and intradermal testing.  
Am J Vet Res 54:69-72.

**YOUNG KM, WALKER SL, LANTHIER C, WADDELL WT, MONFORT SL, BROWN JL (2004):**

Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses.  
Gen Comp Endocrinol 137:148-165.

**ZAGER PG, FREY HJ, SPALDING CT, WENGES WJ, BRITTENHAM MC (1986):**

Distribution of 18-hydroxycorticosterone between red blood cells and plasma.  
J Clin Endocrinol Metab 62:84-89.

**ZIMMER C und REUSCH CE (2003):**

Untersuchungen zum Kortisol-Kreatinin-Verhältnis im Urin (UCC) bei gesunden Katzen.  
Schweiz Arch Tierheilk 145:323-328.

**ZIMMER C, HÖRAUF A und REUSCH C (2000):**

Ultrasonographic examination of the adrenal gland and evaluation of the hypophyseal-adrenal axis in 20 cats.

J Small Anim Pract 41:156-160.

**ZUCKERMAN-LEVIN N, TIOSANO D, EISENHOFER G, BORNSTEIN S, HOCHBERG Z (2001):**

The importance of adrenocortical glucocorticoids for adrenomedullary and physiological response to stress: a study in isolated glucocorticoid deficiency.

J Clin Endocrinol Metab 86:5920-5924

## Danksagung

Meinen großen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. M. Erhard aussprechen für die Überlassung dieses Themas, die stets freundliche Unterstützung und Beratung während der Entstehungsphase und für die Endkorrektur dieser Arbeit.

Meinem Betreuer, Herrn Dr. F. Ahrens, möchte ich ganz besonders danken für die Zeit und Geduld beim Beantworten meiner Fragen, für das Erstellen der nicht ganz einfachen Statistik und natürlich auch für die Korrektur meiner Dissertation.

Auch Frau Dr. T. Iki, einer sehr engen Mitarbeiterin dieses Projekts, die durch die Edith-Haberland-Wagner-Stiftung gefördert wurde, sowie Frau Dr. A. Bartels und Nicole Zobel gilt ein großes Dankeschön für die Mithilfe und Unterstützung während der praktischen Versuchsphase mit „unseren Miezen“.

Ebenso möchte ich mich herzlich beim Team des Zentrums für präklinische Forschung (ZPF) des Klinikums Rechts der Isar München bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei Frau Dr. C. Baumgartner, Herrn Prof. Dr. W. Erhardt und Frau Dr. A.-K. Preissel, die alle hervorragend bei der Implantation des Portsystems mitgewirkt haben.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung, insbesondere Herrn Hermann Kuchler und Herrn Christian Strobl möchte ich danken für die Einweisung und große Unterstützung im Labor.

Ein großes Dankeschön geht auch nach Rohrdorf zu Herrn Dr. S. Rehbein, Herrn Dr. M. Wiedemann und Herrn Dr. M. Knaus und allen Mitarbeitern des Kathrinenhof für die Organisation und Hilfe vor Ort.

Auch meinen beiden Korrektoren Fred Keicher und Sonja Scheungrab möchte ich für ihre wertvolle Arbeit danken.

Meinen Eltern möchte ich für die Unterstützung danken, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Meinem Freund Konrad möchte ich danken für die tatkräftige Unterstützung bei Fragen rund um den PC, bei der Hilfestellung während dem Erstellen der Statistik und zu aller Letzt für die persönliche Unterstützung während der ganzen Zeit.