

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

Stress- und Schmerzbelastung des Schweines bei Entnahme eines  
Tracheobronchialabstriches im Vergleich zum Nasentupfer und der  
Fixierung in der Oberkieferschlinge

von  
Christine Weiß  
aus  
Altötting

München 2015

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Krankheiten des Schweines

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Mitbetreuung durch: Dr. Nicole Übel und Dr. Susanne Zöls

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

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

**Korreferent:** Univ.-Prof. Dr. Dr. Michael Erhard

**Tag der Promotion: 31. Januar 2015**

*Meiner Familie, meinen Freunden und den Tieren*

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>11</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>13</b>
<b>1.</b>	<b>Diagnostische Mittel.....</b>	<b>13</b>
1.1.	Gesetzliche Grundlagen .....	13
1.2.	Diagnostik von Atemwegserkrankungen beim Schwein .....	13
1.2.1.	Bronchoalveoläre Lavage .....	14
1.2.2.	Tracheobronchialabstrich.....	15
1.2.3.	Nasentupfer .....	16
<b>2.</b>	<b>Stress und Wohlbefinden .....</b>	<b>17</b>
<b>3.</b>	<b>Schmerz.....</b>	<b>18</b>
3.1.	Schmerzentstehung, Weiterleitung und Wahrnehmung.....	19
3.2.	Innervation der untersuchten Regionen .....	20
<b>4.</b>	<b>Untersuchte Parameter.....</b>	<b>22</b>
4.1.	Cortisol.....	23
4.1.1.	Wirkung im Organismus .....	23
4.1.2.	Transport und Ausscheidung .....	24
4.1.3.	Speichelcortisol .....	25
4.1.4.	Regulation .....	25
4.1.5.	Circadiane Rhythmik .....	26
4.2.	Katecholamine .....	27
4.2.1.	Wirkung im Organismus .....	28
4.2.2.	Bedeutung im Stressgeschehen .....	28
4.2.3.	Regulation .....	29
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>31</b>
<b>1.</b>	<b>Ziel der Untersuchung .....</b>	<b>31</b>
<b>2.</b>	<b>Genehmigung des Tierversuchsvorhabens .....</b>	<b>31</b>
<b>3.</b>	<b>Studientiere und Haltung .....</b>	<b>31</b>
<b>4.</b>	<b>Auswahl der Studientiere .....</b>	<b>31</b>

<b>5.</b>	<b>Gruppeneinteilung .....</b>	<b>32</b>
<b>6.</b>	<b>Ablauf der Cortisoluntersuchungen.....</b>	<b>32</b>
<b>7.</b>	<b>Ablauf der Katecholaminuntersuchungen .....</b>	<b>34</b>
<b>8.</b>	<b>Eingriffe .....</b>	<b>36</b>
8.1.	Durchführung eines Tracheobronchialabstriches.....	36
8.2.	Fixierung in der Oberkieferschlinge .....	37
8.3.	Entnahme einer Nasentupferprobe.....	37
<b>9.</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>38</b>
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>40</b>
<b>1.</b>	<b>Cortisol.....</b>	<b>40</b>
1.1.	Serumcortisol .....	40
1.2.	Speichelcortisol.....	44
<b>2.</b>	<b>Katecholamine .....</b>	<b>47</b>
2.1.	Noradrenalin.....	47
2.2.	Adrenalin.....	50
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>53</b>
<b>1.</b>	<b>Cortisol.....</b>	<b>54</b>
1.1.	Kontrollgruppe .....	55
1.2.	Fixierung in der Oberkieferschlinge .....	56
1.3.	Nasentupferentnahme.....	57
1.4.	Tracheobronchialabstrichentnahme .....	58
1.5.	Speichelcortisol.....	60
1.6.	AUC .....	61
<b>2.</b>	<b>Katecholamine .....</b>	<b>62</b>
2.1.	Kontrollgruppe .....	62
2.2.	Fixierung in der Oberkieferschlinge .....	62
2.3.	Nasentupfer- und Tracheobronchialabstrichentnahme .....	63
<b>VI.</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG.....</b>	<b>67</b>
<b>VII.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>69</b>

---

<b>VIII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>71</b>
<b>IX.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>73</b>
<b>X.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>89</b>
<b>XI.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>90</b>
<b>XII.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>92</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon	pCBG	porcines Corticosteroid-bindendes Globulin
Abb.	Abbildung	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
App.	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	PCV2	porcines Circovirus Typ 2
AUC	area-under-the-curve	pg	Pikogramm
ca.	circa	PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E2
CBG	Cortisol-bindendes Globulin	RL	Richtlinie
cm	Zentimeter	PRRSV	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon	SD	Standardabweichung (standard deviation)
h	Stunde(n)	sec	Sekunde(n)
HHN	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren	SIV	Influenza-A-Virus
HWZ	Halbwertszeit	SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
l	Liter	TÄBEO	Berufsordnung für die Tierärzte
MESOR	midline estimating statistic of rhythm	TIERSCHG	Tierschutzgesetz
M. hyo	<i>M. hyopneumoniae</i>	U/min	Umdrehungen pro Minute
min	Minute(n)		
ml	Milliliter		
nmol	Nanomol		
NNM	Nebennierenmark		
NNR	Nebennierenrinde		

## **I. EINLEITUNG**

Atemwegsinfektionen sind weltweit in Schweinebeständen verbreitet, führen auf Grund von Gewebeschädigungen zu Schmerzen bei den betroffenen Tieren und verursachen hohe wirtschaftliche Verluste (HENKE und ERHARDT, 2001; VAN ALSTINE, 2012). Die Verbesserung des Tierwohls sowie die Reduzierung von Antibiotika in der Nutztierhaltung liegen derzeit im Fokus des tierärztlichen und gesellschaftlichen Interesses. Ein besonderes Augenmerk gilt daher der Krankheitsprophylaxe durch Impfungen. Dafür bedarf es einer ätiologischen Diagnose, die es ermöglicht Atemwegsinfektionen gezielt vorzubeugen (GROSSE BEILAGE et al., 2013). Als Diagnostikmethode bei Atemwegserkrankungen des Schweines wird in Deutschland seit circa zehn Jahren die Bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt. Zur Vorbereitung auf die BAL müssen die Schweine narkotisiert werden (FLASSHOFF, 1996), um eine sichere Fixierung zu gewährleisten und um dem Schwein die Erstickungsangst zu ersparen, die durch Einbringen von Flüssigkeit in die Lunge hervorgerufen wird (PAUSENBERGER et al., 2012). Allerdings birgt die Narkose von Tieren, die unter Atemwegserkrankungen leiden, ein erhöhtes Narkoserisiko (LENDL und HENKE, 2011). Des Weiteren müssen die Tiere bis zur Wiedererlangung des Bewusstseins separat aufgestellt werden. Das Narkoserisiko und der höhere Zeit- und Kostenaufwand begrenzen folglich die Anzahl der beprobten Tiere (PAUSENBERGER et al., 2012). Von FABLET et al. (2010) wurde erstmalig ein Tracheobronchialabstrich, der ohne Narkose durchgeführt wird, zur Gewinnung von Sekret aus den tiefen Atemwegen beschrieben. Da es keiner Narkose bedarf, bietet sich diese Methode dafür an eine größere Anzahl von Proben zu sammeln (PAUSENBERGER et al., 2012). Laut PAUSENBERGER et al. (2012) sind Tracheobronchialabstrichproben ebenso geeignet wie das Material der BAL um eine Aussage über die Besiedlung der Lunge mit pathogenen Erregern hinsichtlich Kolonisationszeitpunkten und -prävalenzen zu ermöglichen. Darüber hinaus sind Nasentupferproben zum Nachweis von Erregern der oberen Atemwege etabliert (GROSSE BEILAGE et al., 2013).

In der Verantwortung als Tierarzt und der zunehmenden Bedeutung des Tierschutzgedankens in der Gesellschaft ist es notwendig Eingriffe am Tier neben ihrer diagnostischen Eignung auch auf Tiergerechtigkeit zu überprüfen.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Stress- und Schmerzbelastung von Schweinen auf Grundlage der Arbeitshypothese, dass ein Tracheobronchialabstrich, der ohne Narkose durchgeführt wird, mit einer größeren Belastung für die Schweine einhergeht als die Entnahme eines Nasentupfers oder die Fixierung in der Oberkieferschlinge. Als Parameter dienten Cortisolkonzentrationen aus Serum und Speichel sowie aus dem Blutplasma ermittelte Noradrenalin- und AdrenalinKonzentrationen.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Diagnostische Mittel**

#### **1.1. Gesetzliche Grundlagen**

Die Notwendigkeit und die Anforderungen an eine tierärztliche Diagnose werden zum einen in der Berufsordnung der Bayerischen Landestierärztekammer und zum anderen im deutschen Tierschutzgesetz geregelt (TÄBEO, 2011; TIERSCHG, 2013). Die Aufgaben des Tierarztes erstrecken sich über die Bewahrung der Gesundheit der Tierbestände bis zur Gesunderhaltung des Menschen (TÄBEO, 2011). In § 1(1) steht „Der Tierarzt/die Tierärztin (im folgenden "Tierarzt" genannt) ist berufen, Leiden und Krankheiten der Tiere zu verhüten, zu lindern und zu heilen, zur Erhaltung und Entwicklung eines leistungsfähigen Tierbestandes beizutragen [...]“ (TÄBEO, 2011). Auch das deutsche Tierschutzgesetz beschreibt im Grundsatz, dass es in der Verantwortung des Menschen für das Tier als Mitgeschöpf liegt, dessen Leben und Wohlbefinden zu schützen und, dass niemand einem Tier ohne vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schäden zufügen darf (TIERSCHG, 2013). Der vierte Abschnitt dieses Gesetzes befasst sich mit Eingriffen an Tieren. Grundsätzlich gilt laut §5 (1), dass an einem Wirbeltier ohne Betäubung ein mit Schmerzen verbundener Eingriff nicht vorgenommen werden darf (TIERSCHG, 2013). Im Folgenden, zweiten Abschnitt, werden auch Ausnahmen von dieser Regel gewährt, unter anderem sofern „bei vergleichbaren Eingriffen am Menschen eine Betäubung in der Regel unterbleibt oder der mit dem Eingriff verbundene Schmerz geringfügiger ist als die mit einer Betäubung verbundene Beeinträchtigung des Befindens des Tieres“ (TIERSCHG, 2013).

#### **1.2. Diagnostik von Atemwegserkrankungen beim Schwein**

Große Bedeutung für den Erfolg von diagnostischen Untersuchungen hat die Auswahl geeigneter Tiere, idealerweise werden akut kranke, unbehandelte Tiere mit typischer Symptomatik ausgewählt (GROSSE BEILAGE et al., 2013; HÖLTIG und HENNIG-PAUKA, 2013). Ungünstig auf die Interpretation der Befunde wirkt sich die Untersuchung chronisch kranker Tiere aus, die zwar Veränderungen aufweisen, welche aber nicht unmittelbar mit der

Primärerkrankung in Zusammenhang stehen (GROSSE BEILAGE et al., 2013; HÖLTIG und HENNIG-PAUKA, 2013). Jeglicher weiterführenden Untersuchung sollte eine eingehende Anamnese und klinische Allgemeinuntersuchung sowie die spezielle Untersuchung des Atmungstraktes voraus gehen (GROSSE BEILAGE et al., 2013).

### **1.2.1. Bronchoalveoläre Lavage**

Seit circa zehn Jahren gehört die Bronchoalveoläre Lavage (BAL) in Deutschland zu den Diagnostikmethoden bei Atemwegserkrankungen des Schweines (FLASSHOFF, 1996; NIENHOFF et al., 2006; PALZER, 2006; MOORKAMP et al., 2008). In der Literatur werden bezüglich der Durchführung verschiedene Methoden beschrieben (GROSSE BEILAGE et al., 2013). HENNIG-PAUKA et al. (2008) empfahlen die bronchoskopische Lavage für wissenschaftliche Untersuchungen, während sich die transtracheale Lavage für den Einsatz in der Praxis zur bakteriologischen und zytologischen Befunderhebung eignet. Mittels bronchoskopisch gewonnenener Proben lässt sich die höchste diagnostische Sensitivität für Genomfragmente von *M. hyopneumoniae* erzielen (HENNIG-PAUKA et al., 2008). Die für die bronchoskopischen Methoden benötigten technischen Hilfsmittel sind nur nach aufwendiger Reinigung und Desinfektion in unterschiedlichen Schweinebetrieben einsetzbar (GROSSE BEILAGE et al., 2013). In der Praxis haben sich laut GROSSE BEILAGE et al. (2013) Methoden ohne Sichtkontrolle mit transoralem, transnasalem oder transtrachealem Zugang etabliert. Für den transnasalen Zugang wird das Schwein in der Oberkieferschlinge fixiert und nicht narkotisiert (GROSSE BEILAGE et al., 2013). Das Einbringen von Flüssigkeit in die Lunge ist aber laut PAUSENBERGER et al. (2012) aus Tierschutzgründen kritisch zu hinterfragen, da die Tiere unter Erstickungsangst leiden können. Die Lungenspülung unter transoralem und transtrachealem Zugang erfordert eine Allgemeinanästhesie mittels Azaperon und Ketamin (NIENHOFF et al., 2006; GROSSE BEILAGE et al., 2013). ERHARDT et al. (2011) warnten, dass die Narkose von Tieren mit Atemwegserkrankungen zu einem erhöhten Narkoserisiko führt, da durch Einführen des Spülkatheters und durch die zusätzlich eingebrachte Flüssigkeit eine weitere Verkleinerung der Luftwege mit Zunahme des Atemwiderstandes und Hypoventilation erfolgt (LENDL und HENKE, 2011). Um narkosebedingte Todesfälle zu vermeiden, sind schwer erkrankte Schweine von der Lungenspülung

auszuschließen (GROSSE BEILAGE et al., 2013). Gespült wird mit steriler physiologischer Kochsalzlösung (FLASSHOFF, 1996). Bei der transtrachealen Methode ist die Gefahr der Kontamination mit Umgebungskeimen, die nicht aus der Lunge stammen, am geringsten (HENNIG-PAUKA et al., 2008). Für die Interpretation der Ergebnisse ist es sinnvoll mehrere Proben bakteriologisch-kulturell oder molekularbiologisch untersuchen zu lassen (HÖLTIG und HENNIG-PAUKA, 2013). Außerdem empfiehlt sich eine zusätzliche zytologische Untersuchung hinsichtlich Entzündungszeichen, da viele bakterielle Erreger auch in gesunden Schweinen zu finden sind (GROSSE BEILAGE et al., 2013).

### 1.2.2. Tracheobronchialabstrich

FABLET et al. beschrieben erstmalig im Jahr 2010 die Entnahme von Tracheobronchialtupfern zur Gewinnung von Sekret aus den tiefen Atemwegen. Dazu werden die Schweine mit einer Oberkieferschlinge unmittelbar hinter den Eckzähnen fixiert und ein Maulkeil zum Offenhalten der Maulspalte eingelegt (FABLET et al., 2010). Im Anschluss wird ein steriler Katheter, wie er zur trachealen Intubation verwendet wird, bei Einatmung des Tieres in die Luftröhre vorgeschoben und unter Drehen auf und ab bewegt (FABLET et al., 2010). Zum Versand ins Labor wird die Probe in 2 ml gepufferter Peptonwasserbouillon transportiert (FABLET et al., 2010). MAROIS et al. (2007) beschrieben den Tracheatupfer und die BAL als effektivere Methoden zur Detektion von *M. hyopneumoniae* im Vergleich zu Nasen- oder Tonsillentupfern. Zu ähnlichem Ergebnis kamen FABLET et al. (2010). Auch in ihrer Studie erwiesen sich BAL und Tracheobronchialtupfer gleichermaßen als sensitivste Methoden zur Diagnose von *M. hyopneumoniae* mittels nested-PCR (FABLET et al., 2010). PAUSENBERGER et al. (2012) führten den Begriff Tracheobronchialabstrich ein, weil dieser der Methode in der deutschen Sprache am nächsten kommt. PAUSENBERGER et al. (2013) wiesen aus Tracheobronchialabstrichen mittels PCR Genomfragmente von *M. hyopneumoniae* (*M. hyo*), Influenza-A-Virus (SIV), Porcines Circovirus Typ 2 (PCV2), Porcines Respiratorisches und Reproduktives Syndrom Virus (PRRSV), *Haemophilus parasuis* spp. und *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) nach und führten auch eine erfolgreiche bakteriologische Untersuchungen auf  $\alpha$ -hämolysierende *Streptococcus* spp., *Pasteurella* spp., *Bordetella* spp. und Keime mit Verdacht auf *Haemophilus* spp. durch. Dafür wurde die Spitze des Tracheobronchialabstrichkatheters nach der

Entnahme abgeschnitten und in ein Röhrchen mit 2 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung überführt. Davon wurde 1 ml abpipettiert und ins Labor versandt (PAUSENBERGER et al., 2013). Unter Berücksichtigung einer ausreichend großen Stichprobenzahl ließ sich nach PAUSENBERGER et al. (2013) eine Einschätzung zu Kolonisationsdruck, -prävalenz und -zeitpunkt geben. Vorteilhaft wirkt sich laut HÖLTIG und HENNIG-PAUKA (2013) auch aus, dass das Sekret von den Tracheobronchialabstrichen im Gegensatz zur BAL unverdünnt gewonnen wird. Nach PAUSENBERGER et al. (2012) ist die Gewinnung von Tracheobronchialabstrichen einfach durchzuführen und man benötigt zusätzlich zur Ausrüstung nur einen Maulkeil (FABLET et al., 2010).

### 1.2.3. Nasentupfer

Ferner dienen Nasentupfer zur Diagnose von Atemwegserkrankungen deren Erreger sich direkt auf oder in der Nasenschleimhaut vermehren (GROSSE BEILAGE et al., 2013). Zur Probengewinnung werden sie in die Nasenhöhle eingeführt und mehrmals über der Schleimhaut vor- und zurückgedreht um möglichst viel Zellgewebe aufzunehmen (BUER, 2012). Um Irritationen und Verletzungen zu vermeiden empfohlen GROSSE BEILAGE et al. (2013) Ferkel bis zu einem Gewicht von 15 kg auf dem Arm zu halten und zusätzlich noch durch eine Hand des Probennehmers zu immobilisieren. Tiere ab 15 kg werden mittels Oberkieferschlinge fixiert (GROSSE BEILAGE et al., 2013). Nasentupfer sind geeignet zur Untersuchung auf toxinbildende *Pasteurella-multocida*-Stämme (SCHOSS und ALT, 1995; HÖLTIG und HENNIG-PAUKA, 2013) sowie zum Nachweis von Influenza (GOODELL et al., 2013; GROSSE BEILAGE et al., 2013). Besteht die Infektion mit Influenza-A-Virus bereits länger als zwei Tage, ist ein Nachweis aus Nasentupfern nicht mehr möglich, daher sollten akut kranke Tiere in der Fieberphase zur Untersuchung ausgewählt werden (VAN REETH et al., 2012; GROSSE BEILAGE et al., 2013; HÖLTIG und HENNIG-PAUKA, 2013), die Symptome wie Niesen, Nasenausfluss oder Bindehautentzündung zeigen (HÖLTIG und HENNIG-PAUKA, 2013). Da sich an einem Nasentupfer nur sehr wenig Material anheftet, ist nach NATHUES und GROSSE BEILAGE (2009) ein Nachweisverfahren mit hoher Sensitivität wie nested PCR oder Real-time-PCR zu wählen. Im Gegensatz dazu sind Nasentupfer laut GROSSE BEILAGE et al. (2013) für den Nachweis von Infektionen der tiefen Atemwege nicht geeignet. Im Vergleich zum Nasentupfer erwies sich der

Tracheobronchialabstrich in einer Studie von FABLET et al. (2010) dreieinhalb mal sensitiver für den Nachweis von *M. hyopneumoniae*, da *M. hyopneumoniae* sich an das Flimmerepithel anheftet und sich im unteren Respirationstrakt vermehrt (BLANCHARD et al., 1992; KURTH et al., 2002; MAROIS et al., 2007; FABLET et al., 2010). Die Aussagekraft der Nasentupferproben hinsichtlich der festgestellten Erreger ist, je nach Fragestellung, sehr unterschiedlich, da eine Vielzahl von Erregern auch bei gesunden Tieren Nasen- und Rachenraum besiedelt (GROSSE BEILAGE et al., 2013; HÖLTIG und HENNIG-PAUKA, 2013).

## **2. Stress und Wohlbefinden**

VEISSIER und BOISSY (2007) schlussfolgerten, dass Wohlbefinden und Stress gegensätzliche Konzepte bezüglich des mentalen Zustandes eines Individuums darstellen, da sich Wohlbefinden und Stress gegenseitig ausschließen. Das „Stress-System“ reagiert mit einer Stress-Antwort, wenn die Homeostase, ein komplexes dynamisches Gleichgewicht des Lebewesens, welches internen und externen Einflüssen, den sogenannten Stressoren unterliegt, gestört wird (CHROUSOS et al., 1995; CHROUSOS, 2009). Die Stress-Antwort ist gekennzeichnet durch ein Zusammenspiel des Endokrinen-, des Nerven- und des Immunsystems (SMITH und VALE, 2006), schließt die Aktivierung der HHN-Achse sowie des sympathischen Nervensystems ein und hilft dem Tier auf Veränderung zu reagieren (VEISSIER und BOISSY, 2007). Um das Wohlbefinden von Nutztieren zu untersuchen wurden viele Studien zur Basalfunktion der HHN-Achse und den Reaktionen auf Umweltreize durchgeführt (MORMEDE et al., 2007). Unter anderem führt Frustration zu einer Erhöhung des Plasmacortisolspiegels und zu Verhaltensänderungen (DANTZER et al., 1980). In einer Untersuchung von DANTZER et al. (1980) wurden Schweine trainiert Futter als Belohnung auf eine bestimmte Handlung zu erlangen. Anschließend wurde Frustration erzeugt indem die Belohnung vorenthalten wurde. Diese Schweine reagierten mit einem erhöhten Cortisolspiegel und aggressivem Verhalten gegen ein anderes, begleitendes Tier (DANTZER et al., 1980). MORMEDE et al. (2007) diskutierten die Grenzen der Messung der Aktivität der HHN-Achse. Da im Gegensatz zu akuten Stressreizen, die nicht zwingend schädigend sein müssen, bei moderaten, länger andauernden Belastungen Cortisolkonzentrationen weniger aussagekräftig sind, ist ein mehrdimensionaler

Ansatz zur Evaluierung von Wohlbefinden nötig, der Verhaltensbeobachtung, Produktionsdaten und Krankheitsinzidenzen berücksichtigt (MORMEDE et al., 2007). Stress steht auch in direktem Zusammenhang mit Angst und Schmerz und unterliegt gegenseitiger Beeinflussung (HENKE und ERHARDT, 2001). Durch die Reduktion von Stress und Angst kann die Schmerzschwelle angehoben werden (HENKE und ERHARDT, 2001).

### **3. Schmerz**

„Schmerz ist ein aversives Gefühl oder eine Sinneswahrnehmung, die mit tatsächlicher oder potentieller Gewebeschädigung einhergeht“ (BROOM, 2001). Ähnlich wird Schmerz auch von der International Society for the Study of Pain (1979) beschrieben, die statt aversiv das Adjektiv „unangenehm“ verwendet. Vom Schmerz betroffene Individuen können von diesen Erfahrungen lernen, um diese negativen Situationen in Zukunft zu meiden (BROOM, 2001). MELLOR et al. (2000) beschrieben, dass die Möglichkeiten der Schmerzwahrnehmung bei allen Spezies gleich sensitiv sind, sich die Schmerztoleranz hingegen unterscheidet. Sie differenzierten zwischen den Begriffen „stress“ der mit unterschiedlich großen Veränderungen physiologischer Zustände einhergeht und „distress“ der den emotionalen Anteil schmerzhafter Ereignisse sowohl emotionaler als auch physischer Natur beschreibt (MELLOR et al., 2000). Zusätzlich prägten MELLOR et al. (2000) den Ausdruck „pain induced distress“ der verdeutlicht, dass emotionale und physikalische Komponenten untrennbar zusammenwirken und sich in der Antwort des Organismus auf die schädigende Noxe widerspiegeln (MELLOR et al., 2000). Schmerz löst viele Veränderungen physiologischer Parameter und des Verhaltens aus (MELLOR et al., 2000). MELLOR und STAFFORD (2004) stellten einen Leitfaden zur Beurteilung von schmerzbedingtem Stress mit folgenden fünf Kriterien zusammen: die zur Schmerzbeurteilung herangezogenen Parameter müssen bei einem nicht schmerzhaften Tier absent sein; es muss sichergestellt werden, dass der zu verwendende Parameter das Maß der zu untersuchenden, einzelnen schmerzhaften Aktion wiedergibt und nicht nur die Gesamtheit des Schmerzes; die Sicherheit von Verhaltensparametern soll mit Hilfe physiologischer Parameter überprüft werden; eine Übertragbarkeit auf andere Tierarten und eine Beeinflussung der Ergebnisse durch andere Faktoren wie z.B. Geschlecht, Rasse und Alter muss sorgfältig geprüft werden (MELLOR und STAFFORD, 2004).

### 3.1. Schmerzentstehung, Weiterleitung und Wahrnehmung

Die Nozizeption beschreibt die Reizaufnahme durch Nozिसensoren, die nervale Weiterleitung und zentrale Verarbeitung, wohingegen Schmerz laut SILBERNAGEL und DESPOPOULUS (2012a) einer anschließenden subjektiven Empfindung entspricht. Schmerzauslösende Reize werden in der Peripherie durch Nozizeptoren von Kopf und Körper aufgenommen, deren Zellkörper in den Spinalganglien der Dorsalwurzel des Rückenmarks und den Trigeminalganglien liegen (JULIUS und BASBAUM, 2001; PFANNKUCHE, 2008; SANN, 2010). Neben den viszerale Organen sind Nozizeptoren in fast allen somatischen Körperbereichen außer dem ZNS vertreten (PFANNKUCHE, 2008). Nozizeptoren können polymodal durch unterschiedliche Reize (z.B. thermische, mechanische und chemische) oder seltener unimodal durch einen bestimmten Reiz erregt werden (SCHOLZ und WOOLF, 2002; BROOKS und TRACEY, 2005). Sogenannte schlafende Nozizeptoren verstärken den Schmerz und werden nur durch pathologische Zustände erregt (SANN, 2010). Entzündungen, Gewebeerstörungen und Tumorzellen werden von SCHOLZ und WOOLF (2002) zur „inflammatory soup“ zusammengefasst, welche die Nozizeptoren sensibilisiert. Die Nozizeptoren können auf Grund ihrer anatomischen und funktionellen Unterschiede in Gruppen eingeteilt werden (HENKE und ERHARDT, 2001; JULIUS und BASBAUM, 2001). Grundsätzlich gilt, je dicker eine Nervenfasern, desto höher ist deren Leitungsgeschwindigkeit (JULIUS und BASBAUM, 2001). Aus der Peripherie vermitteln die Nozizeptoren Signale über die Spinalganglien zum Rückenmark, wo sie über den *tractus spinothalamicus* zum Thalamus weitergeleitet werden (LÖSCHER und FREY, 2010) ebenso wie an sympathische Efferenzen und Motoneurone, die eine reflektorische Antwort auslösen können (HENKE und ERHARDT, 2001; PFANNKUCHE, 2008). Vom Thalamus werden Signale zum somatosensorischen Kortex, wo der Schmerzentstehungsort lokalisiert wird aber auch zum Hirnstamm weitergeleitet, wodurch Schmerzen Atmung und Kreislauf beeinflussen können (HENKE und ERHARDT, 2001; LÖSCHER und FREY, 2010; SILBERNAGEL und DESPOPOULUS, 2012a). Die somatosensorische Hirnrinde ist laut LÖSCHER und FREY (2010) in Projektionsfelder für unterschiedliche Körperregionen unterteilt. Die Größe dieser Felder richtet sich nicht nach der abgebildeten Körperoberfläche sondern nach der Rezeptorendichte des jeweiligen Körperareals (LÖSCHER und FREY, 2010). Deshalb ist laut LÖSCHER und FREY (2010)

z.B. das Gesicht, das wichtig für den Tastsinn ist, entsprechend größer dimensioniert. Außerdem besteht eine Verbindung zwischen Thalamus und Hypophyse, die unter Schmerzeinwirkung endokrin die Freisetzung von ACTH und  $\beta$ -Endorphin aus dem Hypophysenvorderlappen steuert (HENKE und ERHARDT, 2001). Die Nozizeption wird über descendierende Bahnen im Thalamus und Rückenmark gehemmt (SILBERNAGEL und DESPOPOULUS, 2012a). Laut PFANNKUCHE (2008) dient dies möglicherweise zur Schmerzunterdrückung in körperlichen Extremsituationen wie Flucht, Kampf oder Geburt. Die wichtigste Rolle als Transmitter in der körpereigenen Schmerzunterdrückung spielen endogene Opioide (Enkephaline, Dynorphine, Endorphine) (PFANNKUCHE, 2008). PHOGAT und PARVIZI (2007) beschrieben, dass endogene Opioide sowohl physischen als auch psychischen Stress vermindern.

### **3.2. Innervation der untersuchten Regionen**

Organe und Gewebe reagieren unterschiedlich sensibel auf Schmerzreize (HENKE und ERHARDT, 2001). Als hoch sensibel gelten für HENKE und ERHARDT (2001) Zahnpulpa, Cornea, Perianalbereich und die Serosen. Des Weiteren kann auch die Haut, welche über mechanische, thermische und chemische Rezeptoren verfügt, intensive Schmerzsignale senden (HENKE und ERHARDT, 2001). Im Gegensatz dazu sind parenchymatöse Organe weniger sensibel, jedoch kann eine starke Dehnung zu Schmerzhaftigkeit der serösen Häute führen (HENKE und ERHARDT, 2001). Eine geringe Schmerzhaftigkeit weist die Muskulatur auf, die vor allem mit Mechanorezeptoren ausgestattet ist (HENKE und ERHARDT, 2001). Auch Gelenke und Knochen werden von HENKE und ERHARDT (2001) als relativ unsensibel beschrieben. Als schmerzunempfindlich gilt das Gehirn selbst, wohingegen die Meningen besonders sensibel sind (HENKE und ERHARDT, 2001). Durch ausstrahlenden Schmerz empfindlicher Gewebe ergibt sich z.B. eine hohe Schmerzhaftigkeit für den Kopf (HENKE und ERHARDT, 2001). Jedes Körperteil wird auf einem bestimmten Feld des somatosensorischen Kortex somatotopisch repräsentiert (SILBERNAGEL und DESPOPOULUS, 2012a). Dies bedeutet, dass benachbarte Körperregionen auch entsprechend auf den Arealen der Großhirnrinde abgebildet werden (TREEDE, 2007). Allerdings ist bisher wenig über die somatotopische Gliederung beim Schwein erforscht (CRANER und RAY, 1991). CRANER und

RAY (1991) gehen von einer ähnlichen Gliederung der somatosensorischen Gehirnregion beim Schwein wie der bei Menschen aus. Auffällig ist die Überrepräsentation des Rostrums und die mehrfachen Projektionsfelder für Maul, Gesicht und auch Rostrum (CRANER und RAY, 1991). GASTL et al. (2014) konnten beim Menschen eine eigene, bilaterale Projektion für die nasale Mukosa darstellen. Der *N. trigeminus* versorgt über den *N. ethmoidalis* sensibel die Schleimhaut des dorsalen Teils der Nasenhöhle und mit dem *N. nasalis caudalis* (sensibel) die ventralen Anteile der Nasenhöhle und des Gaumens sowie mit dem *N. infraorbitalis*, der vom *N. maxillaris* abzweigt und ebenfalls vom *N. trigeminus* stammt, sensibel die Haut des Nasenrückens und der Nasenseitenwand, den Nasenhöhleneingang und Nasenvorhof sowie die Oberlippe (BUDRAS und BUDA, 2002; NICKEL et al., 2004; KÖNIG et al., 2012). Die menschliche Rachenwand ist laut DE CARLOS et al. (2013) mit verschiedenen Rezeptoren (ähnlich den Ruffini- und Pacini-Tastkörperchen) ausgestattet, die mechanische Reize der oberen Atemwege aufnehmen. Diese Rezeptoren werden von sensorischen Nerven begleitet (DE CARLOS et al., 2013). Der *N. glossopharyngeus* (IX der Vagusgruppe) versorgt laut NICKEL et al. (2004) sensibel das kaudale Drittel der Zunge, die Rachenschleimhaut sowie die Tonsillen. Die Schleimhaut und Drüsen des Gaumens werden von Ästen des *N. trigeminus* sensibel und parasymphatisch innerviert (NICKEL et al., 2004) ebenso wie die Kehlkopfschleimhaut (sensibel) (BUDRAS und BUDA, 2002). Der *N. vagus* versorgt sensibel, motorisch und parasymphatisch die Eingeweide von Kopf, Hals, Brust und Bauchhöhle, wo er sich plexusartig aufteilt (BUDRAS und BUDA, 2002; KÖNIG et al., 2012). Die Lunge wird vom *Plexus pulmonalis* versorgt (KÖNIG und LIEBICH, 2012). Dieser stellt ein Nervengeflecht aus sympathischen Fasern des *Ggl. cervicothoracicum* dar, das sich mit parasymphatischen Anteilen des *N. vagus* verbindet (KÖNIG und LIEBICH, 2012). SILBERNAGEL und DESPOPOULUS (2012b) zählten auch die Irritationsendigungen in der Bronchialschleimhaut zu den Afferenzen der Lunge. Sie sind sowohl beteiligt an einer verstärkten Atmung, aktiviert durch verringertes Lungenvolumen als auch am Hustenreflex, der durch Staub oder reizende Gase ausgelöst wird (SILBERNAGEL und DESPOPOULUS, 2012b). Freie, afferente C-Faserendigungen, die in der Alveolar- und Bronchialwand liegen, sind beim wachen Tier am Husten beteiligt (CANNING et al., 2004; SILBERNAGEL und DESPOPOULUS, 2012b). Diese sind laut CANNING et al. (2004) mehr an der

Signalisierung der Hustennotwendigkeit, als an der Aufrechterhaltung unkontrollierten Hustens beteiligt.

#### **4. Untersuchte Parameter**

Zur Einschätzung von Emotionen und Gefühlen von Tieren ist man auf die Erhebung messbarer Größen angewiesen, von denen man annimmt, dass sie sich mit dem Zustand eines Tieres verändern (MORMEDE et al., 2007). Grundsätzlich sollte die Aktivität eines Individuums beurteilt werden, die unter dem Einfluss von Schmerzen sowohl verringert, als auch vermehrt sein kann (HENKE und ERHARDT, 2001). Weitere Informationen bietet auch das äußere Erscheinungsbild (HENKE und ERHARDT, 2001). Für die Einschätzung des Temperamentes setzen HENKE und ERHARDT (2001) voraus, dass das normale Verhalten des Tieres bekannt ist. Akute Schmerzen erzeugen oftmals Lautäußerungen, wobei unter chronischem Schmerz vorwiegend bei größeren Tieren (Schwein, Hund, Schaf) Stöhnen oder Zähneknirschen beobachtet werden kann (HENKE und ERHARDT, 2001). VIÑUELA-FERNÁNDEZ et al. (2007) gaben für die Einschätzung von Schmerz bei Beutetierspezies zu bedenken, dass deren Schmerzverhalten vom notwendigen Fluchtverhalten überdeckt wird. Eine verminderte Futter- und Wasseraufnahme und in der Folge auch reduzierter Harn- und Kotabsatz stellen laut HENKE und ERHARDT (2001) relativ objektive Kriterien dar. Über eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems und der Hypophysen-Nebennierenachse kommt es in Folge von Schmerz- und Belastungssituationen zu einer Katecholamin- und Cortisolausschüttung (VON BORELL, 2013). In vielen Studien zur Schmerzbeurteilung wurden deshalb durch Schmerz beeinflusste physiologische Mess-Parameter untersucht (PEERS et al., 2002; ZÖLS et al., 2006; SCHULZ et al., 2007; ÜBEL, 2011; ZIMMERMANN et al., 2011). Nach einem akuten, kurzen Schmerzreiz dauert eine vermehrte Adrenalinausschüttung am kürzesten an (2-5 min), gefolgt von Noradrenalin (45-60 min) und am längsten wird ACTH und Cortisol in Abhängigkeit von der Schädigung ausgeschüttet (von 2,5 h bis zu 8 h) (MELLOR et al., 2000; MELLOR und STAFFORD, 2000; MELLOR et al., 2002; PEERS et al., 2002). Im Gegensatz zu Cortisol steigen Herzfrequenz und arterieller Blutdruck früher an (MELLOR et al., 2000; MELLOR und STAFFORD, 2000; MELLOR et al., 2002; PEERS et al., 2002). ESCRIBANO et al. (2013) beschrieben einen Anstieg von Chromogranin A im Schweinespeichel nach einer akuten Stresssituation.

#### 4.1. Cortisol

Glucocorticoide spielen eine wichtige Rolle im Intermediärstoffwechsel (GRECO und STABENFELDT, 2013). Ferner kann die Glucocorticoidkonzentration als Antwort auf Stress laut GRECO und STABENFELDT (2013) innerhalb von Minuten ein mehrfaches ihrer ursprünglichen Konzentration erreichen. Dabei ist die Höhe des Anstieges proportional zum auslösenden Stress (GRECO und STABENFELDT, 2013). In einer Studie über die Fixierung von Schweinen in der Oberkieferschlinge beobachteten ROOZEN et al. (1995) bereits dreieinhalb Minuten nach Beginn dieser Maßnahme einen Anstieg. Die Aktivierung der HHN-Achse trägt mit einer verlängerten metabolischen und antiinflammatorischen Antwort zur Erholung und Heilung des Körpers bei (MELLOR et al., 2000). Die Aussagekraft von Cortisol zur Evaluierung von Stress bei Tieren wurde durch viele Studien bestätigt (ROOZEN et al., 1995; ROSOCHACKI et al., 2000; MELLOR et al., 2002; ZÖLS et al., 2006; ÜBEL, 2011).

##### 4.1.1. Wirkung im Organismus

Die Nebenniere besteht aus zwei Anteilen, dem Nebennierenmark (NNM) und der umgebenden Nebennierenrinde (NNR) (MÖSTL, 2010). In den Markzellen werden Adrenalin und Noradrenalin gespeichert, (Näheres dazu siehe 4.2. Katecholamine) in der *Zona fasciculata* der Nebennierenrinde werden Glucocorticoide, vor allem Cortisol und Corticosteron, und in der *Zona glomerulosa* Mineralocorticoide, hauptsächlich Aldosteron, aus Cholesterol gebildet (MÖSTL, 2010). Außerdem gibt es eine dritte Schicht, die *Zona reticularis* die Sexualsteroidse seziert (GRECO und STABENFELDT, 2013). Im Gegensatz zu Vögeln, Mäusen und Ratten, die hauptsächlich Corticosteron synthetisieren, dominiert bei Schweinen und Wiederkäuern Cortisol (MÖSTL, 2010). Hauptaufgabe der Glucocorticoide ist es den Stoffwechsel zu kontrollieren und die Gluconeogenese in der Leber zu steuern (GRECO und STABENFELDT, 2013).

**Tabelle 1: Zusammenfassung der wichtigsten Wirkungen von Cortisol nach MÖSTL (2010) und SILBERNAGEL und DESPOPOULUS (2012d)**

Wirkung	Folgen	
Proteinkatabolismus	Gluconeogenese aus Aminosäuren → Verhinderung der Aufnahme von Glucose in Muskel- und Fettzellen (GRECO und STABENFELDT, 2013)	Blutglucosespiegel steigt: gesteigerte Glycogenbildung und reduzierte Fettsäuresynthese in der Leber
Antiinflammatorische Wirkung	Stabilisierung der Lysosomen; Gehemmte Lymphokinsynthese und Histaminfreisetzung	
Herz und Kreislauf: positiv inotrope und vasokonstriktorische Wirkung	Verstärkung katecholaminerger Effekte; Cortisol induziert vermehrte Bildung von Adrenalin im NNM und Angiotensinogen in der Leber	

Darüber hinaus entfalten Glucocorticoide eine geringgradige mineralocorticoide Wirkung und tragen dadurch in geringem Maße zur Aufrechterhaltung des Flüssigkeits- und Mineralstoffhaushaltes bei (MÖSTL, 2010).

#### **4.1.2. Transport und Ausscheidung**

Größtenteils sind Glucocorticoide an Proteine gebunden, welche den Transport der lipophilen Steroidhormone im Blutplasma ermöglichen und eine Speicherform darstellen (MÖSTL, 2010; GRECO und STABENFELDT, 2013). 75% des Cortisols sind an Transcortin (Cortisol-bindendes Globulin = CBG) und 15% an Albumin gebunden (GRECO und STABENFELDT, 2013). Nur 10% sind laut GRECO und STABENFELDT (2013) in ungebundener, freier Form im Plasma gelöst. Nur die ungebundenen, freien Corticoide sind biologisch wirksam (MÖSTL, 2010). Durch eine Konformationsänderung des CBG wird Cortisol vermehrt in der Umgebung von Entzündungen freigesetzt (SILBERNAGEL und DESPOPOULUS, 2012d). GRECO und STABENFELDT (2013) geben die biologische Halbwertszeit von Cortisol mit 60 min an. In der Leber erfolgt die Konjugation der Steroidhormone, die dadurch wasserlöslich werden und größtenteils über den Urin und zum Teil über den Kot ausgeschieden werden

(MÖSTL, 2010; GRECO und STABENFELDT, 2013). COOK (2012) fasste unterschiedlichste Medien die sich minimalinvasiv gewinnen lassen und die indirekte Untersuchung von Stress über Cortisol erlauben in seinem Artikel zusammen. Im Gegensatz zu Säugetieren, bei denen sich Cortisol im Speichel, Kot, Urin, Haaren und der Milch nachweisen lässt, ist bei Vögeln auch eine Untersuchung deren Ausscheidungen, der Federn und Eier möglich (COOK, 2012). Er gibt aber auch zu bedenken, dass man bei der Interpretation der Ergebnisse beachten muss, dass die jeweiligen Testmedien eine unterschiedliche Zeitspanne wiedergeben, von wenigen Minuten für Speichelcortisol bis zu mehreren Wochen für die Bildung von Federn (COOK, 2012).

#### **4.1.3. Speichelcortisol**

MERLOT et al. (2011), COOK et al. (1996) und PARROTT und MISSON (1989) empfahlen Speichelcortisolmessungen zum Nachweis einer Aktivierung der HHN-Achse durch einen Stressor. Dabei muss sichergestellt sein, dass ein Vergleich zwischen Basalwerten und Werten nach der Belastung möglich ist (MERLOT et al., 2011). Lipidlösliche, unkonjugierte Hormone wie Testosteron, Progesteron und Cortisol gelangen über den intrazellulären Weg in den Speichel (VINING et al., 1983). Die Konzentrationen dieser Hormone werden durch die Speichelflussrate nicht beeinflusst und spiegeln den ungebundenen, freien Anteil im Plasma wider (VINING et al., 1983). Freies Cortisol entsprach laut SCHÖNREITER et al. (1999) zwischen 11,9 % - 16,4% vom Gesamtcortisol, wobei im Speichel zwischen 5,9 % und 7,5 % des Gesamtcortisols nachgewiesen wurden. Die mittlere Speichelcortisolkonzentration sank laut GALLAGHER et al. (2002) von höheren perinatalen Konzentrationen auf unter 27,6 nmol/l bei 30 Tage alten Ferkeln ab.

#### **4.1.4. Regulation**

Die Glucocorticoidsynthese in der Nebennierenrinde wird durch das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) des Hypophysenvorderlappens gesteuert (GRECO und STABENFELDT, 2013). Die Ausschüttung des ACTH wird wiederum von einer höheren Instanz, dem Hypothalamus, über die Höhe des Corticotropin-Releasing-Hormones (CRH) in einem Feedbacksystem geregelt (CHROUSOS und GOLD, 1992; GRECO und STABENFELDT, 2013). Glucocorticoide vermindern am Hypothalamus über eine negative Rückkopplung

eine weitere Ausschüttung von CRH (GRECO und STABENFELDT, 2013). Das Feedbacksystem wird zum einen von einem circadianen Rhythmus überlagert und zum anderen durch Stress beeinflusst (GRECO und STABENFELDT, 2013). PHOGAT und PARVIZI (2007) zeigten, dass die Beziehung zwischen akutem Stress und Cortisolantwort auch vom beta-adrenergen System und vom Opioidsystem reguliert wird. Sie beschrieben, dass eine starke Stimulation des Beta-Adrenozeptors zu einer vermehrten Freisetzung von Cortisol führt (PHOGAT und PARVIZI, 2007).

#### **4.1.5. Circadiane Rhythmik**

Biologische Rhythmen ermöglichen dem Individuum sich seiner zeitlichen Umgebung anzupassen (MOHR, 2010). Damit kann der Organismus laut MOHR (2010) den Funktionszustand eines Organsystems bereits anpassen, bevor die äußeren Umstände, die eine Veränderung nötig werden lassen, eintreten. Der Begriff „feedforward coupling“ beschreibt die vorausschauende Anpassung des Organismus auf das Kommende, die im Gegensatz zu einer Reaktion schon im Voraus erfolgt (MOHR, 2010). Die Produktion von Glucocorticoiden unterliegt einem tageszeitabhängigen Rhythmus (GRECO und STABENFELDT, 2013). Die höchste Konzentration an Glucocorticoiden besteht bei tagaktiven Tieren zu Sonnenaufgang, kurz vor dem Erwachen (BARNETT et al., 1981). EVANS et al. (1988) beschrieben einen circadianen Rhythmus 28 Wochen alter Schweine, der sich durch eine ausgeprägte Spitze am Morgen, eine schwächere Spitze am Nachmittag und ein Tief am Abend auszeichnete. Für die maximale Blutcortisolkonzentration gaben KLEMCKE et al. (1989) morgens 121,4 nmol/l und für das Minimum abends 35,6 nmol/l an. EKKEL et al. (1996) gaben zu bedenken, dass die Corticosteroidkonzentration zum einen natürlichen Schwankungen unterliegt und zum anderen eine unterschiedliche Hormonantwort auf einen identischen Stimulus, abhängig davon erfolgt, wann während des circadianen Zyklus dieser Reiz erfolgte. Während GALLAGHER et al. (2002) schon bei sechs bis zehn Tage alten Saugferkeln die Stabilisierung eines Zyklus dokumentierten und auch EKKEL et al. (1996) bei acht Wochen alten Schweinen einen ausgeprägten circadianen Rhythmus feststellten, vertraten andere Autoren die Meinung, dass diese tageszeitabhängige Rhythmik bei drei bzw. neun oder 15 Wochen alten Tieren noch nicht entwickelt ist (RUIS et al., 1997; DE JONG et al., 2000; SKARLANDTOVA et al., 2011). EKKEL et al. (1997) untersuchten

den Einfluss von chronischem Stress auf die circadiane Rhythmik sechs und 41 Tage nach Neugruppierung von neun Wochen alten Schweine. Dabei konnten sie keine Unterschiede bezüglich des MESOR (midline estimating statistic of rhythm; durchschnittliches Cortisol Level, angepasst an die circadiane Rhythmik) und der Amplitude des circadianen Rhythmus des Speichelcortisols zwischen gemischten und ungemischten Gruppen feststellen (EKKEK et al., 1997). Für beide Gruppen war aber ein Anstieg des Speichelcortisols sowohl bezüglich des MESOR als auch für die Höhe der Amplitude zu verzeichnen, was möglicherweise auf das höhere Alter zurückzuführen ist (EKKEK et al., 1997). Auch EVANS et al. (1988) beschrieben, dass Schweine erst mit der Pubertät einen erwachsenen circadianen Rhythmus erreichen. Ein deutlicheres Muster entwickelt sich auch mit zunehmendem Gewicht der Schweine (HILLMANN et al., 2008). Außerdem entwickelten Schweine, die in einer angereicherten Umwelt gehalten wurden ab einem Alter von 15 Wochen eine ausgeprägtere circadiane Rhythmik als solche in reizarmer Umgebung (DE JONG et al., 2000). Chronischer Stress führt nach MUNSTERHJELM et al. (2010) unter Umständen zum Ausbleiben eines circadianen Rhythmus.

Ähnliches gilt für die Speichelcortisolkonzentration, die ebenfalls einer circadianen Rhythmik mit höchsten Konzentrationen am späten Vormittag und frühen Nachmittag folgt (EKKEK et al., 1996; RUIS et al., 1997). Mit zunehmendem Alter der Tiere nimmt die basale Cortisolkonzentration ab (EVANS et al., 1988; RUIS et al., 1997). Dies ist nach KATTESH et al. (1990) und RUIS et al. (1997) möglicherweise auf die zunehmende Bindung von freiem Cortisol, welches im Speichel nachgewiesen wird, an CBG zurückzuführen.

#### **4.2. Katecholamine**

Katecholamine werden vom Nebennierenmark konstant freigesetzt und unterstützen den Körper in Belastungssituationen und weniger bei der Basalregulation (MÖSTL, 2010; GRECO und STABENFELDT, 2013). Ihr Ausstoß wird in bestimmten Situationen immens gesteigert um dem Tier eine adäquate, sofortige Anpassung an akute Stresssituationen, die auch als „flight or fight“ Situationen beschrieben werden zu ermöglichen (GRECO und STABENFELDT, 2013). Laut GOLDSTEIN (1987) unterstützt das sympathoadrenerge System den Organismus in Zuständen der Hypovolämie, Hypoxie und Hypoglycämie sowie bei lebensbedrohlichen Schockzuständen.

Dabei steigt der Adrenalin Spiegel im Gegensatz zur Noradrenalin Konzentration stark an (GRECO und STABENFELDT, 2013). Noradrenalin ist Transmitter der postganglionär-sympathischen Neurone, gibt die neuronale sympathische Aktivität wieder und verändert sich unter solchen Zuständen kaum (GOLDSTEIN, 1987).

#### **4.2.1. Wirkung im Organismus**

Die Adrenozeptoren (vier Haupttypen  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  und  $\beta_2$ ) sind unterschiedlich empfindlich für Adrenalin und Noradrenalin (GRECO und STABENFELDT, 2013). Laut MÖSTL (2010) haben  $\beta$ -Rezeptoren eine höhere Affinität zu Adrenalin und  $\alpha$ -Rezeptoren zu Noradrenalin. Mit Einfluss auf das Herz- und Gefäßsystem, unter dem es zur Steigerung des Herzminutenvolumens und zu unterschiedlichen Auswirkungen auf den Gefäßtonus kommt, wird grundsätzlich eine Reduktion der Blutversorgung von Haut, Darm und Niere zu Gunsten der anderen Organe, die eine wichtigere Rolle in Abwehr- und Fluchtreaktionen spielen, erreicht (MÖSTL, 2010). Unter Katecholamineinfluss verbessert sich einerseits die Energieversorgung durch die Erhöhung des Blutzuckerspiegels und die gesteigerte Fettmobilisation andererseits wird auch das respiratorische System angeregt (MÖSTL, 2010).

#### **4.2.2. Bedeutung im Stressgeschehen**

Durch Prämedikation mit einer anxiolytischen Dosis eines Benzodiazepines konnte sowohl der Adrenalin- als auch der Corticosteronanstieg nach einem elektrischen Reiz gemindert werden (DE BOER et al., 1990). Dies weist daraufhin, dass emotionaler Stress und Angst sowohl zu einer Aktivierung des Nebennierenmarkes als auch der -rinde führen (DE BOER et al., 1990). ROOZEN et al. (1995) zeigten bei Sauen nach Halten in der Oberkieferschlinge, dass Adrenalin und Noradrenalin bereits 0,5 min nach dem Beginn der Fixierung anstiegen. Bei ROOZEN et al. (1995) sowie bei NEUBERT et al. (1996) erwiesen sich die Katecholamine als geeignete Parameter zur Detektion von kurzzeitigem Stress bei Schweinen. NEUBERT et al. (1996) empfahlen die Katecholaminmessung als beste Möglichkeit den Grad der Erregung und den Zeitpunkt der körperlichen Anstrengung zu ermitteln. Ähnlich erwiesen sich auch in den Untersuchungen von ZIMMERMANN (2010) zur Kastration männlicher Saugferkel unter CO<sub>2</sub> Betäubung Adrenalin und Noradrenalin als geeignete

Parameter. Direkt nach dem Eingriff stiegen die AdrenalinKonzentrationen um das 29 fache und die NoradrenalinKonzentration um das bis zu 81 fache an (ZIMMERMANN, 2010). Die Aussagekraft der Ergebnisse hängt von der Art des Stimulus ab. Bei Reizen, die einen länger andauernden Zustand erzeugen, ist der Beprobungszeitpunkt weniger wichtig als bei kurzfristigen Stimuli, die eine genau determinierte Probenahme erfordern (HJEMDAHL, 1993). Dafür sollte eine ein bis zwei minütige „wash-out“ Zeit eingeplant werden, welche die Zeitspanne berücksichtigt, die Noradrenalin braucht um vom Ort der Freisetzung ins Blutplasma zu gelangen (HJEMDAHL, 1993). Den Effekt der verzögerten Noradrenalin Freisetzung und Ausschwemmung ins Blut beobachteten auch MELLOR et al. (2002) bei Lämmern, die mit einem Gummiring kastriert wurden und deren Schwänze mittels Gummiring kupiert wurden.

#### **4.2.3. Regulation**

Das sympathische Nervensystem wird vom Hypothalamus und den Kreislaufzentren des ZNS, die wiederum vom limbischen System und dem Cortex beeinflusst werden, gesteuert (MÖSTL, 2010). Das Nebennierenmark kann laut MÖSTL (2010) als sympathisches Ganglion betrachtet werden. Katecholamine (Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin) werden in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarkes gespeichert (AXELROD und REISINE, 1984). Stress führt über unterschiedlich starken Einfluss von neuronaler Aktivität, Glucocorticoiden und ACTH zu einer Aktivitätssteigerung der an der Katecholaminsynthese beteiligten Enzyme (AXELROD und REISINE, 1984). Neben dem Nebennierenmark kann Noradrenalin auch in anderen chromaffinen Geweben gebildet werden (MÖSTL, 2010). Einen weiteren Syntheseort für Katecholamine fanden KVETNANSKY et al. (2012) in den Adipozyten, die vor allem durch physikalischen und psychischen Stress dazu angeregt werden Katecholamine zu synthetisieren und einen großen Einfluss auf die Lipolyse und die Thermoregulation auszuüben vermögen (KVETNANSKY et al., 2009). Zusätzlich zur Hormonwirkung fungiert Noradrenalin als Neurotransmitter im Zentralnervensystem und im Sympathikus (MÖSTL, 2010). Es wird von sympathischen Nervenendigungen ins Blut abgegeben, was die höheren Plasmaspiegel als für Adrenalin erklärt (MÖSTL, 2010). Noradrenalin gibt im Wesentlichen die sympathische Aktivität wieder, wohingegen Adrenalin zur Messung der Sekretion des Nebennierenmarkes dient (AXELROD und REISINE,

1984). Diese Ansicht teilten auch KVETNANSKY et al. (1979), wonach die Noradrenalin Antwort auf Immobilisationsstress hauptsächlich aus den sympathischen Endigungen und zu einem kleineren Teil aus den Nebennieren stammte. Hingegen wird Adrenalin vorwiegend aus dem Nebennierenmark freigesetzt (KVETNANSKY et al., 1979). Bereits bei kurzem, sanftem Handling kann es zu einer starken Freisetzung der Katecholamine kommen, was wiederum die Schwierigkeit erklärt, Basalwerte dafür festzulegen (KVETNANSKY et al., 1978). Die Halbwertszeiten sind sehr kurz und variieren zwischen 20 sec und 10 min (MÖSTL, 2010). Eine Inaktivierung erfolgt bei Wiederaufnahme in die sympathischen Fasern oder die chromaffinen Zellen des NNM durch enzymatische Inaktivierung oder Abbau (z.B. zu Vanillinmandelsäure) (MÖSTL, 2010).

### **III. MATERIAL UND METHODEN**

Die Studie wurde an der Versuchsstation Thalhausen der Technischen Universität München durchgeführt. Die Probenentnahmen erstreckten sich von Mai bis Oktober 2013.

#### **1. Ziel der Untersuchung**

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Stress- und Schmerzbelastung bei Entnahme eines Tracheobronchialabstriches mit der eines Nasentupfers und mit der alleinigen Fixierung in der Oberkieferschlinge beim Schwein zu vergleichen. Zur Ermittlung der Stressbelastung dienten Cortisolkonzentrationen aus Serum und Speichel sowie aus dem Blutplasma ermittelte Noradrenalin- und AdrenalinKonzentrationen.

#### **2. Genehmigung des Tierversuchsvorhabens**

Die Genehmigung des Tierversuchsvorhabens wurde gemäß §8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes bei der Regierung von Oberbayern beantragt und am 27. Mai 2013 erteilt. Das Versuchsvorhaben wird unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-169-12 geführt.

#### **3. Studientiere und Haltung**

Bei den Studientieren handelte es sich um Masthybriden aus der Kreuzung Deutsche Landrasse x Piétrain. Alle Tiere stammten aus der Versuchsstation Thalhausen der Technischen Universität München. Sie wurden zusammen mit ihren Buchtengenossen in den Stallungen der Versuchsstation Thalhausen im Aufzuchtenteil in Buchten zu je zehn Tieren gehalten. Es wurde Beschäftigungsmaterial angeboten. Gefüttert wurde Futter aus Eigenproduktion sowie kommerziell erworbenes Futter ad libitum. Ebenso stand Wasser über Nippeltränken zur freien Verfügung.

#### **4. Auswahl der Studientiere**

Für die Cortisol- und Katecholaminuntersuchungen wurden mindestens 24 Stunden vor einem Studientag klinisch gesunde, weibliche Ferkel in einem Alter von acht Wochen ausgewählt und im Anschluss nach Gewicht in die vier

nachfolgend beschriebenen Gruppen randomisiert eingeteilt. Die Tiere waren bereits betriebsbedingt mit einer individuellen Ohrmarke versehen, zusätzlich wurden sie zur Gruppenzuordnung mit einer Nummer am Rücken markiert. Es wurde darauf geachtet, dass an jedem Studientag die Anzahl der Tiere pro Gruppe ausgeglichen war.

## 5. Gruppeneinteilung

Es wurden vier Gruppen, drei Versuchs- und eine Kontrollgruppe, zu je 23 Tieren für die Cortisoluntersuchungen und zu je 31 Tieren für die Katecholaminuntersuchungen gebildet (siehe Tabelle 2). Im Teilversuch zur Cortisolmessung wurde jeweils ein Tier aus der Gruppe I und IV am Studientag auf Grund klinischer Erkrankung von der Studie ausgeschlossen sowie im Teilversuch zur Katecholaminuntersuchung ein Tier der Gruppe II.

**Tabelle 2: Gruppeneinteilung Cortisol- und Katecholaminuntersuchungen**

Gruppe		Eingriff	Anzahl (n) Studie Cortisol	Anzahl (n) Studie Katecholamine
I	TBA	Tracheobronchialabstrich	22	31
II	OK	Oberkieferschlinge	23	30
III	NT	Nasentupfer	23	31
IV	KO	Kontrolle	22	31

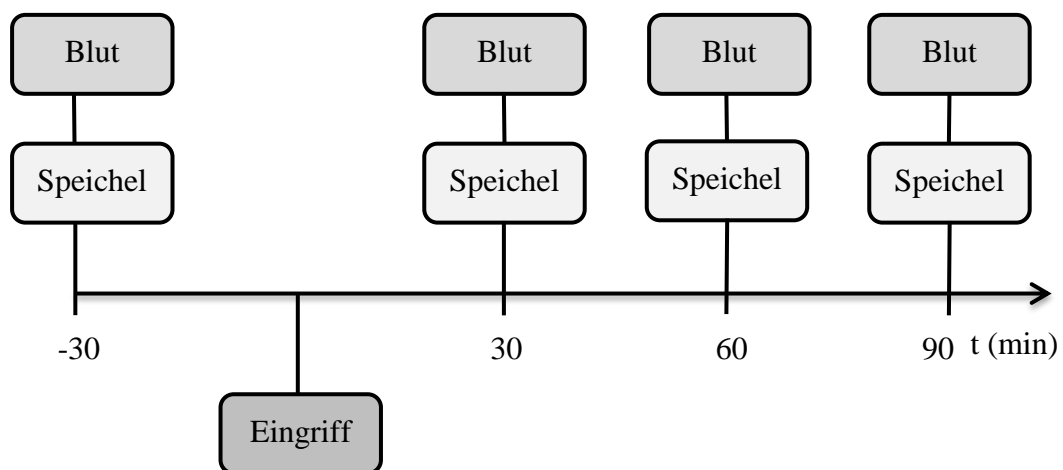
## 6. Ablauf der Cortisoluntersuchungen

### 6.1. Zeitlicher Ablauf

Die im Folgenden beschriebenen Schritte wurden entsprechend der Gruppenzugehörigkeit der Schweine durchgeführt.

Die acht Wochen alten Tiere wurden möglichst ruhig in den Flatdeckbuchten gefangen und herausgehoben. Unmittelbar danach erfolgte die erste Blutprobenentnahme zur Ermittlung der basalen Cortisolkonzentrationen. Im Hinblick auf die circadianen Schwankungen der Cortisolsekretion wurden alle

Blutproben des Basalwertes zwischen 12:00 Uhr und 12:30 Uhr entnommen. Bei zehn Schweinen pro Studientag ergab sich dabei ein dreiminütiger Abstand zwischen den Blutproben. Die Reihenfolge der Tiere wurde für den weiteren Tagesablauf beibehalten. Direkt nach der Blutentnahme wurde eine Speichelprobe gewonnen. Im Anschluss wurde das Schwein wieder in seine Bucht zurückgesetzt. 30 min später wurde dasselbe Tier wieder aus seiner Bucht gefangen und seiner Gruppe entsprechend einer Maßnahme unterzogen (unter 8. Eingriffe beschrieben). 30 min nach dem jeweiligen Eingriff erfolgte die zweite Blut- und Speichelprobenentnahme. Tieren der Gruppe IV wurden diese Proben ohne vorherigen Eingriff entnommen. Zwei weitere Blut- und Speichelproben erfolgten 60 min und 90 min nach dem Eingriff.



**Abbildung 1: Zeitplan der Cortisoluntersuchungen**

## 6.2. Blut- und Speichelprobenentnahme

Die Blut- und Speichelprobenentnahme erfolgte stets durch dieselbe studiendurchführende Person. Die Schweine jeder Gruppe wurden einzeln von einer Hilfsperson aus der Bucht gehoben und auf dem Rücken liegend auf dem Schoß einer Hilfsperson fixiert. Zur Blutentnahme aus der *Vena jugularis externa* wurden Serummonovetten (*Primavette*<sup>®</sup> V, *Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth*) und sterile Einmalkanülen der Größe 20 G (*Sterican, B.Braun AG, Melsungen*) verwendet. Die Serummonovetten wurden vollständig mit 7,5 ml Blut gefüllt.

Im Anschluss an die Blutentnahme wurden die Schweine in Brustlage gedreht und locker auf dem Schoß der assistierenden Person gehalten. Ein mittels

Arterienklemme fixierter Speicheltupfer (*Salivette*<sup>®</sup>, *SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht-Elzenroth*) wurde vorsichtig in die Maulspalte geführt und in kreisenden Bewegungen am Gaumendach und im Kieferwinkel gedreht, bis er ausreichend durchfeuchtet war.

### **6.3. Probenbearbeitung**

Unmittelbar nach der Blutentnahme wurden die Serummonovetten in Eiswasser gekühlt. Die Zentrifugation bei 3000 U/min für die Dauer von 10 min bei einer Temperatur von 4 °C erfolgte noch am selben Tag in der Klinik für Schweine. Aus dem gewonnenen Serum wurden zwei Aliquots zu je mindestens 0,5 ml hergestellt, wovon ein Exemplar als Rückstellprobe asserviert wurde. Die Proben wurden bis zur Bestimmung der Cortisolspiegel für maximal acht Wochen bei -22 °C tiefgefroren.

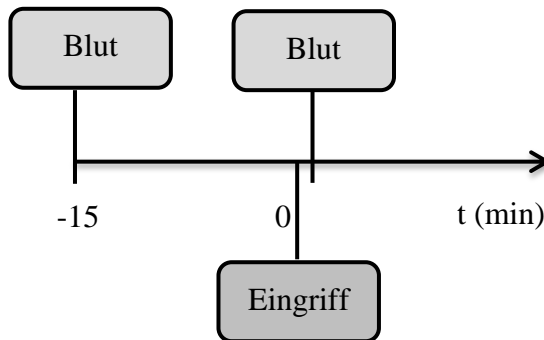
Die Speichelproben wurden bis zur Weiterbearbeitung am Ende des Studientages bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach Zentrifugation bei 3000 U/min für die Dauer von 10 min wurde der gewonnene Speichel in ein Eppendorf Tube (*Fa. Eppendorf AG, 1,5 ml Safe-Lock Tubes, Hamburg*) pipettiert und bei -22 °C tiefgefroren. Die Messung der Cortisolkonzentrationen aus Serum und Speichel wurde im Labor der Klinik für Schweine in Oberschleißheim vorgenommen. Dafür wurde das Gerät *Elecsys 2010*<sup>®</sup> (*Roche Diagnostics, Mannheim*) verwendet. Die Messung erfolgte mittels Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA) mit einem speziellen Messreagenz (*Cortisol Elecsys*<sup>®</sup>, *Roche Diagnostics, Mannheim*).

## **7. Ablauf der Katecholaminuntersuchungen**

### **7.1. Zeitlicher Ablauf**

Die im Folgenden beschriebenen Schritte wurden entsprechend der Gruppeneinteilung nacheinander an allen Schweinen durchgeführt. Die acht Wochen alten Schweine wurden möglichst ruhig in den Flatdeckbuchten gefangen und herausgehoben. Unmittelbar nach dem Einfangen wurde das Schwein in Rückenlage fixiert, um die erste Blutprobe zu gewinnen. Direkt danach wurde das Tier in seine Flatdeckbucht zurückgesetzt. Nach 15 min wurde dasselbe Schwein erneut möglichst stressarm aus der Bucht genommen und dem der jeweiligen Gruppe zugeordneten Eingriff unterzogen (unter 8. Eingriffe beschrieben).

Unmittelbar im Anschluss an den Eingriff wurden die Schweine in Rückenlage fixiert und eine zweite Blutprobe gewonnen. Tieren der Gruppe IV wurde diese Blutprobe ohne vorher erfolgten Eingriff entnommen.



**Abbildung 2: Zeitplan der Katecholaminuntersuchungen**

### 7.2. Blutprobenentnahme

Die Blutprobenentnahme erfolgte entsprechend der für Cortisoluntersuchungen. Allerdings wurden zur Blutentnahme aus der *Vena jugularis externa* EDTA-Plasma-Monovetten (*Primavetten<sup>®</sup> V EDTA 2,6 ml, Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth*) und sterile Einmalkanülen der Größe 20 G (*Sterican, B.Braun AG, Melsungen*) verwendet. Die auf 4 °C vorgekühlten EDTA-Monovetten wurden bis zur Füllgrenze mit Blut gefüllt. Nach der Blutentnahme wurde das Schwein wieder zurückgesetzt.

### 7.3. Probenverarbeitung

Sofort nach der Blutprobenentnahme wurden die befüllten EDTA-Primavetten für maximal fünf Minuten in Eiswasser zwischengelagert bis die Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge (*Hettich Mikro 22R, Fa. Hettich Zentrifugen, Tuttlingen*) bei 4 °C für die Dauer von 10 min erfolgte. Das gewonnene Plasma wurde jeweils zur Hälfte in zwei 1 ml fassende, gekühlte kryostabile Gefäße (*Corning<sup>®</sup> 2 ml, Fa. Corning Incorporated, New York*) pipettiert. Diese wurden in einem Behälter mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, zur Klinik für Schweine in Oberschleißheim transportiert und anschließend bei -80 °C tiefgefroren. Auf Trockeneis wurden die Proben zum Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) nach Dummerstorf zur Bestimmung der Katecholaminkonzentrationen verbracht.

#### **7.4. Messung der Katecholamine**

Die Plasmaproben wurden am Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) in Dummerstorf vom Forschungsbereich Verhaltensphysiologie bearbeitet. Unter Leitung von Herrn Dr. W. Otten wurden die Adrenalin- und Noradrenalinkonzentrationen bestimmt. Die Analyse erfolgte durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit elektrochemischer Detektion nach vorheriger Extraktion der Katecholamine aus dem Plasma durch Absorption an Aluminiumoxid (OTTEN et al., 2013).

### **8. Eingriffe**

#### **8.1. Durchführung eines Tracheobronchialabstriches**

Bei den Tieren der Gruppe I wurde ein Tracheobronchialabstrich nach FABLET et al. (2010) entnommen. Dazu wurden die Schweine möglichst ruhig aus der Bucht gefangen und in den Gang gehoben. Dann wurden sie stehend zwischen den Beinen einer Hilfsperson positioniert und der Kopf mit einer Oberkieferschlinge unmittelbar hinter den Eckzähnen fixiert. Ein Maulkeil wurde zwischen Ober- und Unterkiefer eingelegt, damit die Tiere den Katheter, der im Anschluss eingeführt wurde, nicht abbeißen und verschlucken konnten. Der Katheter aus weichem Kunststoff mit einem Durchmesser von 0,4 cm und 50 cm Länge (*Absaugkatheter CH 12, B.Braun Melsungen AG, Melsungen*) wurde zwischen Drahtschlinge und Gaumen zunächst bis zum ersten Widerstand an der *Epiglottis* vorgeschoben. Um den Kehldeckel zu überwinden wurde sorgfältig auf den Atemrhythmus des Tieres geachtet und der Katheter bei Inspiration mit leichten Drehbewegungen zügig bis zur *Bifurcatio tracheae* vorgeschoben. Dies löste einen Hustenstoß aus. Der Katheter wurde dann sofort wieder herausgezogen, das Tier aus der Fixation gelöst und in die Bucht zurückgesetzt. Der Tracheobronchialabstrich wurde immer von derselben studiendurchführenden Person entnommen.



**Abbildung 3: Durchführung eines Tracheobronchialabstriches**

### **8.2. Fixierung in der Oberkieferschlinge**

Die Tiere der Gruppe II wurden ruhig in der Bucht gefangen und auf den Gang gehoben. Anschließend wurden die Schweine für 60 sec von der studierendurchführenden Person in der Oberkieferschlinge fixiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Tiere unmittelbar zurückgesetzt.

### **8.3. Entnahme einer Nasentupferprobe**

Bei Tieren der Gruppe III wurde ein Nasentupfer entnommen. Dafür wurden die Schweine ruhig in der Bucht gefangen und auf den Gang gehoben. Die Schweine wurden stehend zwischen die Beine einer Hilfsperson und zusätzlich am Kopf mittels Oberkieferschlinge fixiert. Die studierendurchführende Person führte vorsichtig einen Nasentupfer nacheinander in beide Nasenlöcher ein. Der Tupfer wurde jeweils bis zur Hälfte in der Nasenhöhle eingeführt und dabei um ca. 260° gedreht. Nach Entnahme des Tupfers wurde die Fixation aufgehoben und das Schwein zurückgesetzt.

## 9. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Cortisolmessungen wurden mit Hilfe der Programme IBM SPSS Statistics 22.0 und Microsoft Office Excel 2010 ausgewertet. Individuelle Ferkel bildeten die Studieneinheit. Anhand der Messwerte von Serum- und Speichelcortisol und Katecholaminen wurden jeweils Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler ermittelt. Die Nullhypothese besagt, dass kein Unterschied zwischen den Studiengruppen hinsichtlich der untersuchten Parameter besteht.

Die Anwendung des Kolmogorov-Smirnov-Testes mit zusätzlicher Signifikanzkorrektur nach Lilliefors zeigte, dass weder die Serum- noch die Speichelcortisolwerte einer Normalverteilung folgten. Beim Gruppenvergleich wies der Kruskal-Wallis-Test 30 min nach dem Eingriff signifikante Unterschiede sowohl für Serum- als auch Speichelproben nach. Für diesen Zeitpunkt wurden daher Vergleiche zwischen den Gruppen (vier Vergleiche: TBA mit NT, NT mit OK, TBA mit OK und OK mit KO Gruppe) mittels einseitigem Mann-Whitney-Test berechnet. Um den Typ I-Fehler zu verringern, wurde für die Paarvergleiche eine Korrektur nach Bonferroni-Holm vorgenommen. Die Signifikanzniveaus wurden entsprechend geändert und auf 1.25 %, 1.67 %, 2.50 % und 5.00 % angehoben. Es wurde jeweils mit dem p-Wert der höchsten Signifikanz unter den Paarvergleichen begonnen (HOLM, 1979).

Um innerhalb einer Gruppe Vergleiche zwischen zwei unterschiedlichen Beprobungszeitpunkten bilden zu können, wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Test angewendet. Von Interesse waren die Vergleiche zwischen den Zeitpunkten: basal mit 30 min, basal mit 60 min, 60 min mit 90 min, basal mit 90 min Wert. Die vier Vergleiche wurden nach Bonferroni-Holm korrigiert und die Signifikanzniveaus, wie oben angegeben, angepasst.

Für Speichel- und Serumcortisol wurde der AUC (Area-under-the-curve), wie bei BLAND (2009) beschrieben, berechnet. Der Kolmogorov-Smirnov-Test (zusätzliche Signifikanzkorrektur nach Lilliefors) zeigte eine Normalverteilung der AUC Daten. Eine anschließende einseitige ANOVA wurde durchgeführt, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen deutlich zu machen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden vier Paarvergleiche mittels t-Test zum Gruppenvergleich zwischen TBA mit NT, NT mit OK, TBA mit OK und OK mit

KO Gruppe eingeleitet. Auch hierfür wurde eine Bonferroni-Holm Adjustierung angewendet.

Bei der Katecholaminauswertung wurden Tests analog zur Auswertung der Cortisolkonzentrationen angewendet. Der Kolmogorov-Smirnov-Test zeigte, dass die Daten nicht normalverteilt waren. Anschließend wurden signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (vier Vergleiche: TBA mit NT, NT mit OK, TBA mit OK und OK mit KO Gruppe) mittels Mann-Whitney-Test berechnet und die Signifikanzniveaus nach Bonferroni-Holm angepasst. Im Gegensatz dazu konnte für den Wilcoxon-Test, der zwischen vor und nach dem Eingriff verglichen, auf eine Adjustierung nach Bonferroni-Holm verzichtet werden, da es sich nur um einen einzelnen Vergleich handelte.

## IV. ERGEBNISSE

### 1. Cortisol

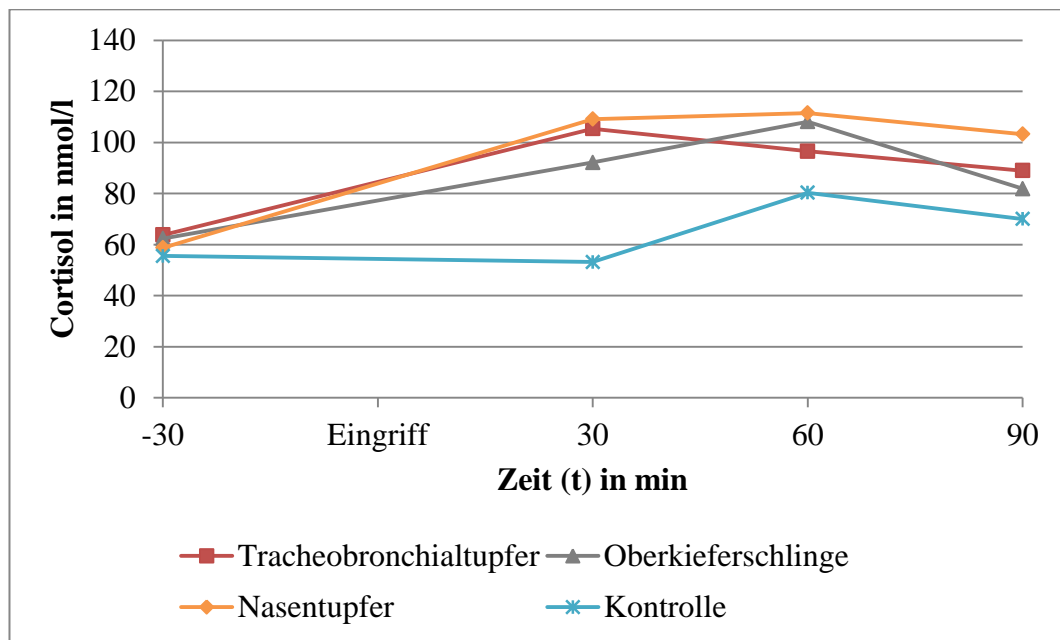
Die mittleren Cortisolkonzentrationen der vier Gruppen variierten zwischen 55,6 nmol/l (KO) und 63,8 nmol/l (TBA) (siehe Tabelle 3) und unterschieden sich vor den Eingriffen nicht signifikant voneinander und.

#### 1.1. Serumcortisol

**Tabelle 3: Mittlere Cortisolkonzentrationen im Serum in nmol/l vor sowie 30 min, 60 min und 90 min nach dem Studieneingriff, mit Minima, Maxima, Standardabweichungen (SD), Standardfehler (SEM) und der area-under-the-curve (AUC) der vier Gruppen**

Gruppe	n	t (min)					AUC
			-30	30	60	90	
TBA	22	MW	63,8	105,4	96,6	89,0	10889,6
		SD	33,6	36,4	33,3	37,2	3558,8
		Min.	16,6	35,1	46,8	34,7	4605,9
		Max.	123,9	173,1	160,3	185,3	16806,0
		SEM	7,2	7,8	7,1	7,9	758,7
OK	23	MW	62,4	92,2	108,2	81,9	10492,8
		SD	19,1	38	60,8	35,3	3709,3
		Min.	25,4	30,6	31,4	31,8	4251,5
		Max.	111,3	166,8	266,7	183,3	17728,5
		SEM	4,0	7,9	12,7	7,4	773,5
NT	23	MW	58,7	109,2	111,6	103,3	11571,9
		SD	23,6	50,6	42,8	40,1	4348,7
		Min.	26,5	37,4	34,3	37,7	4479,5
		Max.	113,4	228,7	219,1	196,8	20999,1
		SEM	4,9	10,6	8,9	8,4	906,8
KO	22	MW	55,6	53,2	80,3	70,1	7520,1
		SD	27,3	28,5	32,7	18,0	2531,2
		Min.	21,8	15,1	32,5	30,0	3490,1
		Max.	109,0	134,1	152,4	96,0	13136,7
		SEM	5,8	6,1	7,0	3,8	539,7

30 min nach dem Eingriff zeigten alle Gruppen außer der Kontrollgruppe einen Anstieg der mittleren Cortisolkonzentrationen. Der höchste Wert mit 109,2 nmol/l war bei der Nasentupfergruppe messbar und entsprach einem signifikanten Anstieg ( $p < 0,001$ ) vom Basalniveau um 86 % (1,9 facher Basalwert). Gefolgt wurde die NT Gruppe von der Tracheobronchialabstrichgruppe mit einer 65 % Erhöhung (1,7 fach) zum Basalwert ( $p < 0,001$ ).



**Abbildung 4: Verlauf der mittleren Cortisolkonzentrationen (nmol/l) im Serum der vier Gruppen über die Zeit t (min)**

Mit einer mittleren Cortisolkonzentration von 105,4 nmol/l erreichte die TBA Gruppe 30 min nach dem Eingriff ihren maximalen Wert. Auch die mittlere Cortisolkonzentration der OK Gruppe lag 30 min nach dem Eingriff mit 92,2 nmol/l signifikant über dem Basallevel ( $p = 0,002$ ). Dies entsprach einer 1,5 fachen Erhöhung (48 % höher als Basallevel) zur Basalkonzentration. 30 min nach dem Eingriff unterschieden sich die mittleren Cortisolkonzentrationen der TBA, NT und OK Gruppe nicht signifikant voneinander (siehe Tabelle 4). Der mittlere Cortisolspiegel der OK Gruppe war um 73 % signifikant höher als der der Kontrollgruppe ( $p = 0,001$ ).

**Tabelle 4: p-Werte der Vergleiche der mittleren Cortisolkonzentrationen oder AUC (Serum) der Gruppen TBA, OK, NT und KO zu den vier Beprobungszeitpunkten**

Vergleiche	-30 min	30 min	60 min	90 min	AUC
TBA – NT	0,813	0,937	0,294	0,186	0,569
TBA – OK	0,937	0,302	0,744	0,581	0,716
OK – KO	0,121	<b>0,001</b>	0,138	0,492	<b>0,003</b>
OK – NT	0,407	0,442	0,557	0,045	0,370

Signifikante Werte (nach Bonferroni-Holm Adjustierung) sind fett angegeben.

Zum Zeitpunkt der dritten Blutprobenentnahme, 60 min nach dem Eingriff, lagen die mittleren Cortisolspiegel aller vier Gruppen signifikant über denen der ersten Blutentnahme (siehe Tabelle 5). Zu diesem Zeitpunkt wurden maximale mittlere Cortisolspiegel bei der OK, NT und KO Gruppe gemessen: die Nasentupfergruppe erreichte mit dem 1,9 fachen des Basalwertes (90 % höher) eine Maximalkonzentration von 111,6 nmol/l. Zu diesem Zeitpunkt wurde mit 108,2 nmol/l auch das Maximum der OK Gruppe gemessen. Dieser Wert war um 73 % höher ( $p = 0,001$ ) als der Basalwert (Erhöhung um das 1,7 fache).

**Tabelle 5: p-Werte der Vergleiche der mittleren Cortisolkonzentrationen (Serum) verschiedener Beprobungszeitpunkte innerhalb einer Gruppe**

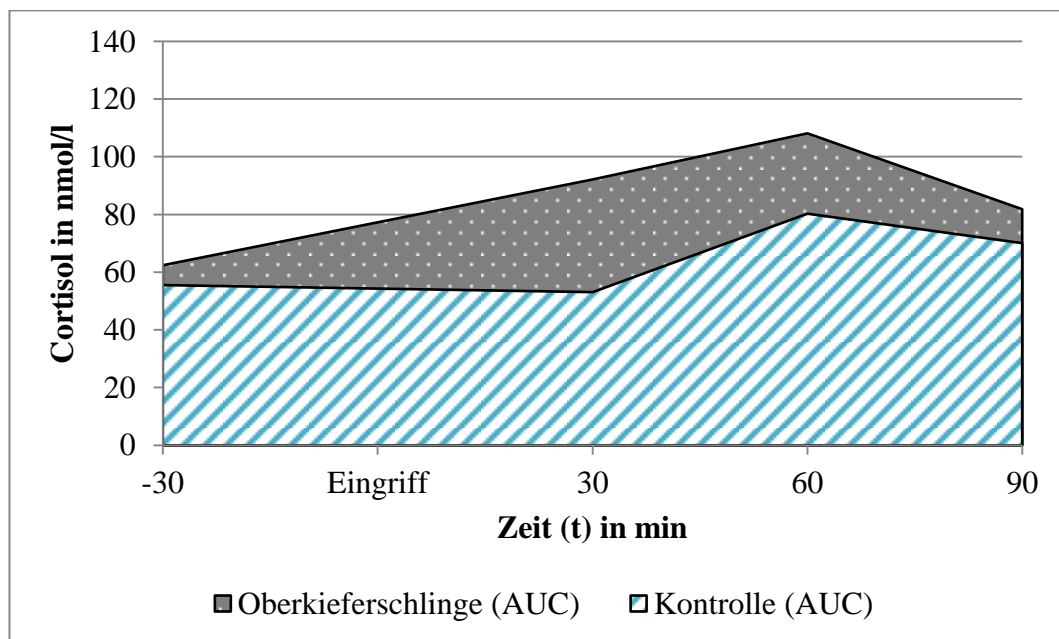
Gruppen	basal - 30 min	basal - 60 min	60 min – 90 min	basal – 90 min
TBA	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,042</b>	<b>0,001</b>
OK	<b>0,002</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,021</b>
NT	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,234	<b>&lt;0,001</b>
KO	0,679	<b>&lt;0,001</b>	0,098	0,039

Signifikante Werte (nach Bonferroni-Holm Adjustierung) sind fett angegeben.

Auch der Cortisolspiegel der Kontrollgruppe stieg bis zum 60 min Wert signifikant um das 1,4 fache (45 %) zum Basalwert an ( $p < 0,001$ ) und erreichte den Maximalwert für diese Gruppe von 80,3 nmol/l. Im Gegensatz dazu sank der mittlere Cortisolspiegel der TBA Gruppe vom 30 min zum 60 min Wert auf 96,6 nmol/l. 60 min nach dem Eingriff waren keine signifikanten Unterschiede bezüglich der mittleren Cortisolkonzentrationen der vier Gruppen messbar (siehe Tabelle 4).

90 min nach dem Eingriff sanken die mittleren Cortisolspiegel aller vier Gruppen

ab. Die Cortisolspiegel der TBA und der OK Gruppe wiesen im Gegensatz zu denen der NT und KO Gruppe eine signifikante Reduktion zwischen der 60. und 90. min auf (siehe Tabelle 5). Zum Zeitpunkt der letzten Blutentnahme unterschieden sich die mittleren Cortisolkonzentrationen der TBA und der NT Gruppe, der TBA und der OK Gruppe, der OK und der NT Gruppe sowie der OK und der KO Gruppe nicht signifikant voneinander (siehe Tabelle 4). Verglichen mit den jeweiligen Basalwerten waren 90 min nach dem Eingriff die mittleren Cortisolkonzentrationen der TBA um 40 %, der OK um 31 % und der NT Gruppe um 76 % signifikant erhöht (siehe Tabelle 5). Nur die Kontrollgruppe unterschied sich zum Zeitpunkt der letzten Blutentnahme nicht signifikant ( $p = 0,039$ ) vom Basalwert (26 % höher als Basalwert).



**Abbildung 5: Verlauf der mittleren Cortisolkonzentrationen im Serum der Gruppen OK und KO (AUC)**

Die Konzentrations-Zeit-Kurven (Area-under-the-curve (AUC)), welche Dauer und Intensität der Belastung beschreiben, unterschieden sich zwischen den Gruppen TBA, OK und NT nicht signifikant. Im Vergleich zwischen der OK und der KO Gruppe lag der AUC der in der Oberkieferschlinge fixierten Tiere signifikant ( $p = 0,003$ ) über jenem der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 5).

## 1.2. Speichelcortisol

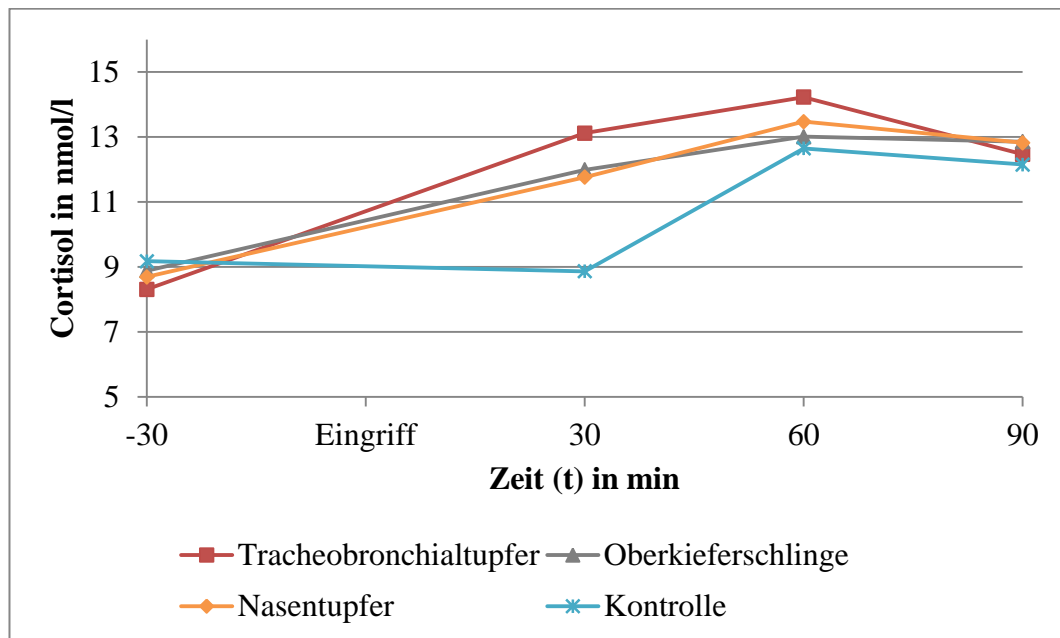
Die mittleren Cortisolkonzentrationen der vier Gruppen variierten für den Basalwert im Speichel zwischen 8,3 nmol/l (TBA) und 9,2 nmol/l (KO) und unterschieden sich nicht signifikant (siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6: Mittlere Cortisolkonzentrationen im Speichel in nmol/l vor sowie 30 min, 60 min und 90 min nach dem Studieneingriff, mit Minima, Maxima, Standardabweichungen (SD), Standardfehler (SEM) und der area-under-the-curve (AUC) der vier Gruppen**

Gruppe	n	t (min)					AUC
			-30	30	60	90	
TBA	22	MW	8,3	13,1	14,2	12,5	1453,7
		SD	1,8	4,0	6,1	3,1	400,6
		Min.	6,1	9,1	7,8	7,8	987,0
		Max.	13,6	23,6	37,1	18,8	2821,0
		SEM	0,4	0,9	1,3	0,7	85,4
OK	23	MW	8,9	12,0	13,0	12,9	1389,4
		SD	1,7	5,8	4,6	6,0	417,2
		Min.	6,1	7,2	7,3	6,1	969,0
		Max.	12,7	36,6	27,3	34,9	2910,0
		SEM	0,4	1,2	1,0	1,2	87,0
NT	23	MW	8,7	11,8	13,5	12,8	1386,9
		SD	3,9	2,8	4,5	3,7	319,7
		Min.	5,8	7,6	7,5	7,9	921,0
		Max.	23,9	16,8	27,5	21,8	2108,0
		SEM	0,8	0,6	0,9	0,8	66,7
KO	22	MW	9,2	8,9	12,7	12,2	1236,1
		SD	2,0	1,9	6,9	2,6	288,3
		Min.	5,9	6,3	6,2	8,3	928,0
		Max.	13,3	13,0	41,4	18,0	2297,0
		SEM	0,4	0,4	1,5	0,5	61,5

Die Cortisolspiegel der TBA, OK und NT Gruppe stiegen 30 min nach dem Eingriff im Speichel signifikant zum Basalwert an (jeweils  $p < 0,001$ ), ohne sich dabei signifikant zwischen den Gruppen zu unterscheiden (siehe Tabelle 7). Die Cortisolkonzentration der KO Gruppe unterschied sich zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme nicht von der Basalkonzentration ( $p = 0,702$ ). Ein signifikanter

Unterschied ergab sich 30 min nach dem Eingriff zwischen der OK Gruppe und der Kontrollgruppe ( $p = 0.001$ ). Der mittlere Cortisolspiegel der OK Gruppe lag 35 % über dem der Kontrollgruppe.



**Abbildung 6: Verlauf der mittleren Cortisolkonzentrationen (nmol/l) im Speichel aller vier Gruppen über die Zeit t (min)**

Alle vier Gruppen erreichten ihr Maximum 60 min nach dem Eingriff. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich bei allen Gruppen ein signifikanter Anstieg zum Basalwert; dieser betrug bei der OK Gruppe 46 % (1,5 facher Anstieg zum Basalwert), bei der NT Gruppe 55 % (1,6 facher Anstieg), bei der TBA Gruppe 71 % (1,7 facher Anstieg) und bei der KO Gruppe 38 % (1,4 facher Anstieg) (siehe Tabelle 8).

**Tabelle 7: p-Werte der Vergleiche der mittleren Cortisolkonzentrationen oder AUC (Speichel) der Gruppen TBA, OK, NT und KO zu den vier Beprobungszeitpunkten**

Vergleiche	-30	30	60	90	AUC
TBA - NT	0,468	0,441	0,706	0,986	0,723
TBA - OK	0,184	0,078	0,338	0,657	0,281
OK - KO	0,732	<b>0,001</b>	0,389	0,645	0,126
OK - NT	0,043	0,459	0,740	0,575	0,683

Signifikante Werte (nach Bonferroni-Holm Adjustierung) sind fett angegeben.

Die mittlere Cortisolkonzentration der TBA Gruppe sank vom 60 min zum 90 min Wert, im Gegensatz zur OK, NT und KO Gruppe, signifikant ab ( $p = 0,039$ ).

Weder 60 min noch 90 min nach dem Eingriff wurden zwischen der TBA, NT, OK und KO Gruppe signifikante Unterschiede festgestellt (siehe Tabelle 7). 90 min nach dem Eingriff lagen die mittleren Speichelcortisolspiegel aller vier Gruppen signifikant über dem Basallevel (siehe Tabelle 8). Zu diesem Zeitpunkt wurden zwischen 32 % (KO Gruppe) und 50 % (TBA Gruppe) höhere Cortisolkonzentrationen als zum Basalwert gemessen.

**Tabelle 8: p-Werte der Vergleiche der mittleren Cortisolkonzentrationen (Speichel) verschiedener Beprobungszeitpunkte innerhalb einer Gruppe**

Gruppen	basal - 30 min	basal - 60 min	60 min – 90 min	basal – 90 min
<b>TBA</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,039</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>OK</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,771	<b>&lt;0,001</b>
<b>NT</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,468	<b>0,001</b>
<b>KO</b>	0,702	<b>0,001</b>	0,633	<b>&lt;0,001</b>

Signifikante Werte (nach Bonferroni-Holm Adjustierung) sind fett angegeben.

Die AUC der Speichelcortisolkonzentrationen wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen der TBA, NT, OK und der Kontrollgruppe auf (siehe Tabelle 7).

## 2. Katecholamine

### 2.1. Noradrenalin

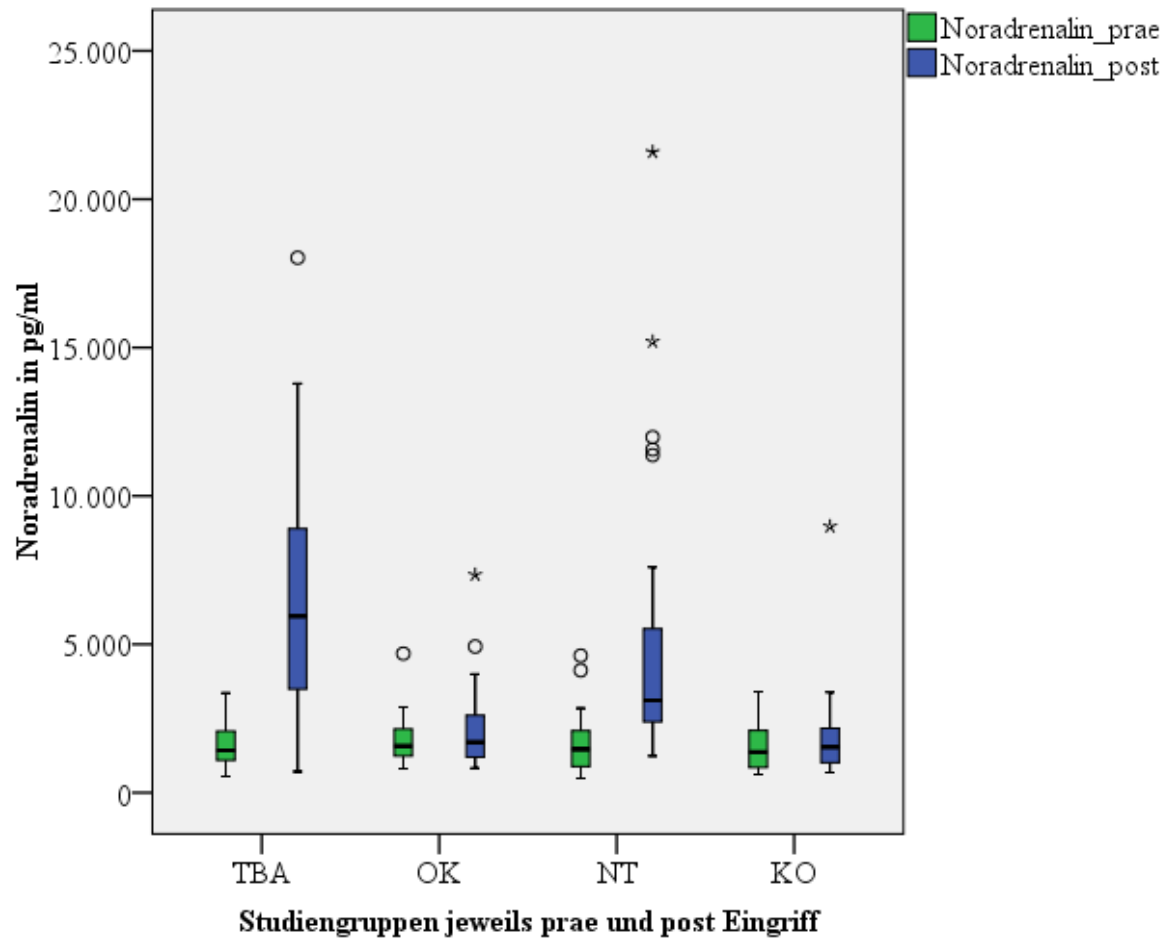
Die mittleren NoradrenalinKonzentrationen der vier Gruppen zeigten 15 min vor dem Eingriff keine signifikanten Unterschiede (untersuchte Vergleiche: TBA mit NT, TBA mit OK, OK mit NT Gruppe). Sie bewegten sich in einer Höhe von 1541 pg/ml (TBA) bis 1780 pg/ml (OK) (siehe Tabelle 9).

**Tabelle 9: Mittlere NoradrenalinKonzentrationen, Standardabweichungen (SD), Minima, Maxima und Standardfehler (SEM) der vier Gruppen in pg/ml Plasma vor (prae) und nach (post) dem Eingriff**

Gruppe	n		prae	post
TBA	31	MW	1541	6413
		SD	658	4154
		Min.	548	712
		Max.	3353	18028
		SEM	118,1	746,0
OK	30	MW	1780	2103
		SD	771	1414
		Min.	808	826
		Max.	4688	7344
		SEM	140,8	258,1
NT	31	MW	1642	5053
		SD	986	4674
		Min.	488	1241
		Max.	4618	21590
		SEM	162,0	654,6
KO	31	MW	1577	1871
		SD	754	1550
		Min.	617	683
		Max.	3399	8972
		SEM	135,5	278,3

Unmittelbar nach dem Eingriff zeigten alle Gruppen eine Erhöhung der mittleren Noradrenalin Spiegel im Vergleich zum Basalwert. Der niedrigste mittlere Noradrenalin Spiegel nach dem Eingriff wurde bei den Tieren der Kontrollgruppe

mit 1871 pg/ml (1,2 facher Anstieg) gemessen ( $p = 0,595$ ).



**Abbildung 7: Mittlere NoradrenalinKonzentrationen (pg/ml Plasma) der vier Gruppen vor (prae) und nach (post) dem Eingriff**

Den höchsten mittleren Wert mit 6412 pg/ml nach dem Eingriff verzeichneten die Tiere der Trachobronchialtupfergruppe. Dies entsprach einem signifikanten Anstieg zum Basallevel ( $p < 0,001$ ) um 316 % (4,2 fach höher als Basalwert). Die TBA Gruppe wurde gefolgt von der Nasentupfergruppe, deren mittlere NoradrenalinKonzentration vom Basalwert um das 3,1 fache (208 %) signifikant ( $p < 0,001$ ) auf 5053 pg/ml anstieg (siehe Tabelle 11). Diese beiden Gruppen, TBA und NT, unterschieden sich nach dem Eingriff nicht signifikant voneinander (siehe Tabelle 10). Bei den Tieren, die in der Oberkieferschlinge gehalten wurden, wurde nach dem Eingriff eine mittlere NoradrenalinKonzentration von 2103 pg/ml gemessen. Im Vergleich zum Basalwert war dieser Noradrenalinspiegel um 18 % höher (1,2 fach) ( $p = 0,073$ ) (siehe Abbildung 7).

**Tabelle 10: p-Werte der Vergleiche der mittleren NoradrenalinKonzentrationen der Gruppen TBA, OK, NT und KO zu den zwei Beprobungszeitpunkten**

Vergleiche	prae	post
TBA – NT	0,955	0,071
TBA – OK	0,236	<b>&lt;0,001</b>
OK – KO	0,280	0,236
OK – NT	0,266	<b>&lt;0,001</b>

Signifikante Werte (nach Bonferroni-Holm Adjustierung) sind fett angegeben.

Nach dem Eingriff überstieg die mittlere NoradrenalinKonzentration der Tracheobronchialabstrichgruppe ( $p < 0,001$ ) als auch der Nasentupfergruppe ( $p < 0,001$ ) signifikant den Noradrenalin Spiegel der Oberkieferschlingengruppe. Zwischen der mittleren NoradrenalinKonzentration der Tiere, die mit der Oberkieferschlinge fixiert wurden und den Tieren der Kontrollgruppe wurde kein signifikanter Unterschied ermittelt (siehe Tabelle 10).

**Tabelle 11: p-Werte der Vergleiche der mittleren NoradrenalinKonzentrationen innerhalb einer Gruppe im Vergleich prae / post Eingriff**

Gruppen	prae / post
TBA	<b>&lt;0,001</b>
OK	0,073
NT	<b>&lt;0,001</b>
KO	0,595

Signifikante Werte (nach Bonferroni-Holm Adjustierung) sind fett angegeben.

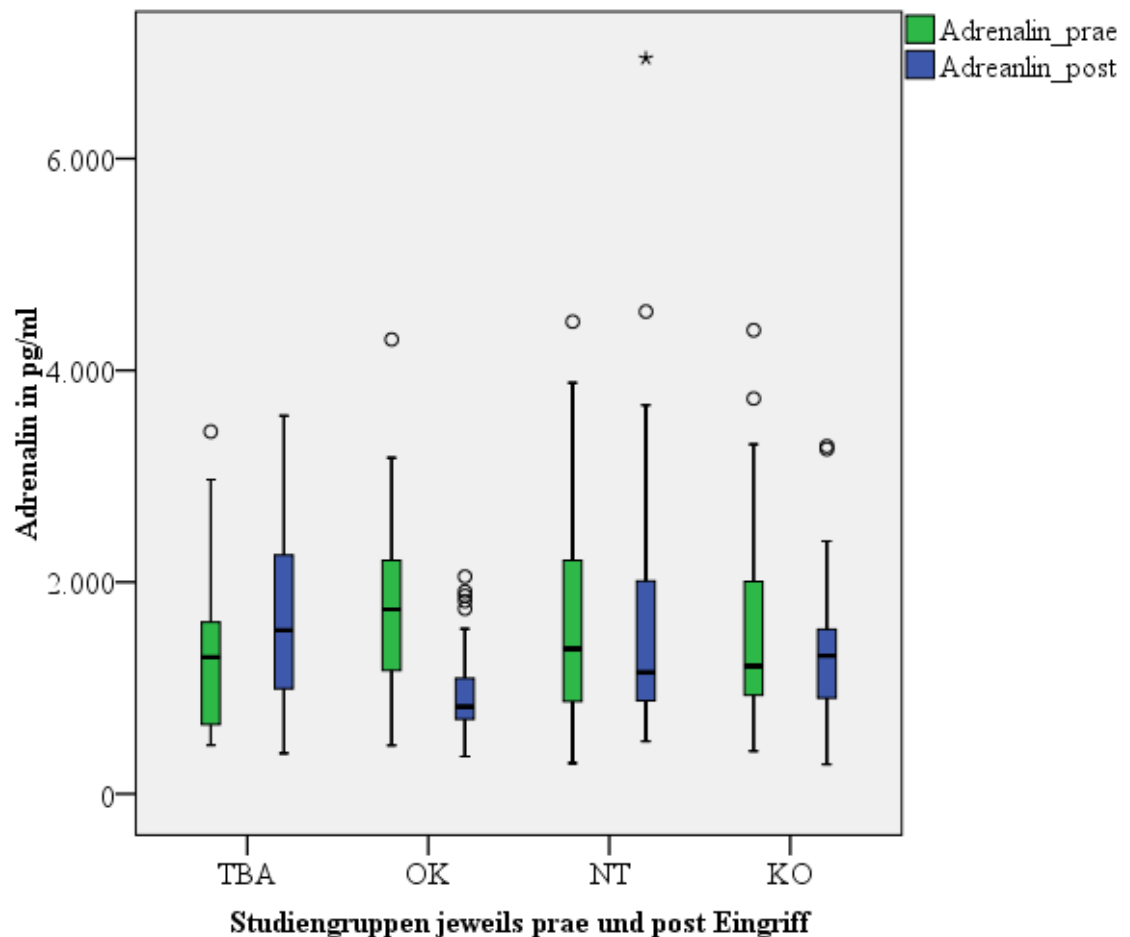
## 2.2. Adrenalin

Bei den mittleren basalen Adrenalinkonzentrationen ließen sich für die Vergleiche der OK mit der NT Gruppe, der NT mit der TBA Gruppe sowie der OK mit der KO Gruppe keine signifikanten Unterschiede feststellen.

**Tabelle 12: Mittlere Adrenalinkonzentrationen, Standardabweichungen (SD), Minima, Maxima und Standardfehler (SEM) der vier Gruppen (pg/ml Plasma) vor (prae) und nach (post) dem Eingriff**

Gruppe	n		prae	post
TBA	31	MW	1327	1661
		SD	728	888
		Min.	460	382
		Max.	3422	3571
		SEM	130,7	159,5
OK	30	MW	1802	975
		SD	843	477
		Min.	459	354
		Max.	4292	2052
		SEM	154,0	87,1
NT	31	MW	1649	1649
		SD	1088	1352
		Min.	290	498
		Max.	4460	6948
		SEM	195,1	172,2
KO	31	MW	1661	1420
		SD	1024	709
		Min.	402	279
		Max.	4378	3285
		SEM	183,9	127,4

Die höchste mittlere basale Adrenalinkonzentration wurde bei der OK Gruppe mit 1802 pg/ml gemessen. Damit unterschied sich die OK Gruppe signifikant ( $p = 0,021$ ) von der TBA Gruppe, welche die niedrigste mittlere Adrenalinkonzentration aufwies (1327 pg/ml). Die Adrenalinpiegel der Nasentupfergruppe und der Kontrollgruppe verzeichneten mittlere basale Adrenalinkonzentrationen von 1649 pg/ml (NT) und 1661 pg/ml (KO).



**Abbildung 8: Mittlere Adrenalinkonzentrationen (in pg/ml Plasma) der vier Gruppen vor (prae) und nach (post) dem Eingriff**

Im Gegensatz zu den anderen drei Gruppen stieg der Adrenalinpiegel der TBA Gruppe unmittelbar nach dem Eingriff um 25 % (1,2 fache Erhöhung) auf 1661 pg/ml an (siehe Abbildung 8), wohingegen die mittlere Adrenalinkonzentration der Tiere der NT Gruppe mit 1649 pg/ml vor und nach dem Eingriff unverändert blieb. Die Adrenalinkonzentrationen der OK Gruppe und der KO Gruppe sanken ab. Nach dem Eingriff war die Adrenalinkonzentration bei der Kontrollgruppe um 14 % niedriger als die basale Konzentration ( $p > 0,05$ ). Die in der Oberkieferschlinge fixierten Tiere zeigten nach dem Eingriff einen um 45 % signifikant niedrigeren Adrenalinpiegel (975 pg/ml) ( $p < 0,001$ ). Für die anderen drei Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den basalen Adrenalinspiegeln und den Adrenalinspiegeln derselben Gruppen nach dem Eingriff festgestellt werden (siehe Tabelle 14).

**Tabelle 13: p-Werte der Vergleiche der mittleren AdrenalinKonzentrationen zwischen den Gruppen TBA, OK, NT und KO zu den zwei Beprobungszeitpunkten**

Vergleiche	prae	Post
TBA – NT	0,409	0,458
TBA – OK	<b>0,021</b>	<b>0,001</b>
OK – KO	0,253	<b>0,008</b>
OK – NT	0,247	<b>0,007</b>

Signifikante Werte (nach Bonferroni-Holm Adjustierung) sind fett angegeben.

Nach dem Eingriff war die mittlere AdrenalinKonzentration der Tiere der OK Gruppe im Vergleich zur TBA, NT und KO Gruppe signifikant niedriger (siehe Tabelle 13). Die Tiere der TBA Gruppe unterschieden sich nicht signifikant von der NT Gruppe zum zweiten Blutentnahmezeitpunkt ( $p = 0,458$ ).

**Tabelle 14: p-Werte der Vergleiche der mittleren AdrenalinKonzentrationen innerhalb einer Gruppe im Vergleich prae / post Eingriff**

Gruppen	prae / post
TBA	0,083
OK	<b>&lt;0,001</b>
NT	0,977
KO	0,595

## V. DISKUSSION

In der Verantwortung als Tierarzt und der zunehmenden Bedeutung des Tierschutzgedankens in der Gesellschaft ist es notwendig, Eingriffe am Tier neben ihrer diagnostischen Eignung auch auf Tiergerechtigkeit zu überprüfen. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Belastung bei der Entnahme von Tracheobronchialabstrichen mit der von Nasentupfern zu vergleichen. Nasentupfer sind zum Nachweis toxinbildender *Pasteurella-multocida*-Stämme (SCHOSS und ALT, 1995; HÖLTIG und HENNIG-PAUKA, 2013) und von Influenza geeignet (GOODELL et al., 2013; GROSSE BEILAGE et al., 2013). Die Gewinnung von Sekret durch Entnahme von Tracheobronchialtupfern wurde erstmalig von FABLET et al. (2010)) beschrieben. Die diagnostischen Ergebnisse der Tracheobronchialabstriche stimmten mit denen der BAL für die Erreger des Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC) überein (PAUSENBERGER et al., 2012). Die Bronchoalveoläre Lavage (BAL) wird bereits seit ca. zehn Jahren zur Diagnostik von Atemwegserkrankungen erfolgreich beim Schwein genutzt. Dafür werden die Schweine mittels Azaperon / Ketamin-Neuroleptanalgesie narkotisiert (GROSSE BEILAGE et al., 2013). Die Narkose ist notwendig um den Stress, der durch das Einbringen von Flüssigkeit in die Lunge für das Tier entsteht zu vermeiden (PAUSENBERGER et al., 2012). Allerdings ist dadurch kein Vergleich dieser Methode hinsichtlich Stressbelastung mit der des Tracheobronchialabstriches, der im wachen Zustand durchgeführt wird, möglich, da die Belastung für das Tier bei der BAL auf Grund der Narkose selbst und nicht durch die Manipulation zur BAL entsteht. Dies geht mit Ergebnissen von SCHULZ (2007) einher, die besagten, dass durch eine Narkose die Katecholaminausschüttung in Folge einer Fixation verändert wird.

Zum Vergleich der Stressbelastung bei der Entnahme von Tracheobronchialabstrichen mit der von Nasentupfern, wurden Cortisol- und Katecholaminkonzentrationen in Blut und Speichel bestimmt. Um Rückschlüsse auf den Anteil der Stressantwort, der sich durch die dafür notwendige Fixation der Schweine mit der Oberkieferschlinge ergab, ziehen zu können, wurde eine Gruppe von Schweinen nur in der Oberkieferschlinge gehalten. Überdies konnten die Veränderungen die durch wiederholtes Einfangen und Blutprobenentnahme entstanden mit Hilfe der Kontrollgruppe abgeschätzt werden. Cortisol in Serum

und Speichel wurde als Parameter zur Ermittlung von akutem Stress der sowohl durch emotionalen als auch physischen Schmerz ausgelöst wurde, gewählt (MELLOR et al., 2000). Als weitere Parameter zur Ermittlung der Belastung in der vorliegenden Studie wurden die Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin gewählt. Sie geben die Aktivität des sympathischen, adrenomedullären Systems wieder, das vor allem in „fight-fright-flight“ Situationen schnell adaptiert und damit Gegenwehr oder Flucht ermöglicht (MELLOR et al., 2000).

## **1. Cortisol**

In der vorliegenden Studie wurden zur Bestimmung der Aktivität der HHN-Achse sowohl Speichel- als auch Serumproben gewonnen und deren Cortisolkonzentrationen ermittelt. Die Aussagekraft von Cortisol als Parameter zur Stress- und Schmerzbelastung konnte in vielen Studien belegt werden (ROOZEN et al., 1995; ZÖLS, 2006; LANGHOFF et al., 2009). Ferner wurde eine gute Korrelation zwischen Speichel- und Blutcortisolspiegeln sowie die Eignung von Speichelcortisol zum Nachweis der Aktivierung der HHN-Achse bereits in mehreren Studien gezeigt (PARROTT et al., 1989; SCHÖNREITER et al., 1999; MERLOT et al., 2011). Serum- und Speichelcortisol wurden in der vorliegenden Studie zwar in der gleichen Maßeinheit von nmol/l angegeben, sie unterschieden sich aber in der Höhe der gemessenen Werte. So wurden für die Speichelcortisolspiegel Mittelwerte zwischen 8,3 nmol/l und 14,3 nmol/l ermittelt, für Serumcortisol hingegen mittlere Konzentrationen zwischen 55,6 nmol/l und 111,6 nmol/l. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von PARROTT et al. (1989), die den Basalwert der Speichelcortisolkonzentration in Höhe von 10 % der Serumcortisolkonzentration angaben. Die Speichelcortisolkonzentration spiegelt den ungebundenen Anteil des Plasmacortisols wider und wird durch die Speichelflussrate nicht beeinflusst wird (VINING et al., 1983). Eine wiederholte Speichelprobenentnahme beeinflusste die Ergebnisse der Speichelcortisolkonzentration von Aufzuchtschweinen nach COOK et al. (2013) nicht. Dieser Vorteil konnte allerdings in der vorliegenden Studie nicht genutzt werden. Um die Anzahl der Versuchstiere gering zu halten wurden demselben Tier, welches der mehrfachen Blutprobenentnahme ausgesetzt war gleichzeitig auch Speichelproben entnommen. Diese wiederholten Venenpunktionen stellten eine unerwünschte zusätzliche Belastung und eine Störvariable dar, die laut EKKEL et al. (1996) auch ethisch zu diskutieren ist. Ein Nachteil von

Speichelcortisol im Vergleich zu Serumcortisol als Messgröße für Stress- und Schmerzbelastung ist die geringere Sensitivität (PARROTT et al., 1989). Darauf deutet eine Studie von PARROTT et al. (1989) hin, bei der nach ACTH Stimulation für Plasmacortisol ein maximaler Anstieg um 230 % und für Speichelcortisol nur um 130 % beobachtet werden konnte. Andererseits stieg in einer Arbeit von SCHÖNREITER et al. (1999) Speichelcortisol nach Kastration um 255,7 % und damit deutlich höher als von PARROTT et al. (1989) erwartet.

In die vorliegende Studie wurden nur weibliche Tiere aufgenommen, da nach RUIS et al. (1997) männliche Schweine im Mittel einen höheren basalen Speichelcortisolspiegel zeigten, der unter anderem in der vorausgegangenen Kastration begründet liegen könnte. Großer Berücksichtigung erfordert die circadiane Rhythmik der Cortisolsekretion in der vorliegenden Untersuchung. Im Gegensatz zu Arbeiten die sich mit der Cortisolantwort nach Saugferkelkastration beschäftigten (ZÖLS, 2006; SCHULZ, 2007), waren bei den acht Wochen alten Studientieren alle Eingriffe stets zur selben Tageszeit durchzuführen. Die Angaben über die Entwicklung eines stabilen tageszeitabhängigen Rhythmus variierten bei verschiedenen Autoren. Das Alter in dem sich ein tageszeitabhängiger Rhythmus bildet, wurde zwischen der ersten Lebenswoche eines Ferkels bis zum Eintritt in die Pubertät angegeben (RUIS et al., 1997; GALLAGHER et al., 2002) und von EKKEL et al. (1996) bereits für acht Wochen alte Schweine beobachtet. Um eine additive Beeinflussung der gemessenen Konzentrationen durch tageszeitabhängige Cortisolausschüttung zu vermindern, wurde der Beprobungsdurchgang an jedem Studientag mittags zum tageszeitlichen Cortisol Minimalniveau begonnen (MERLOT et al., 2011).

### **1.1. Kontrollgruppe**

Die Tiere der Kontrollgruppe wurden nur zu den Blutprobenentnahmen herausgefangen. Zum Zeitpunkt des Eingriffes wurden sie ohne Beunruhigung in der Bucht belassen. Daraus ergab sich für diese Schweine eine einstündige Pause zwischen der ersten und zweiten Blutprobe. In dieser Zeit sanken die Cortisolkonzentrationen der Tiere ab, bei der zweiten Blutprobe wurden wieder Serum- und Speichelcortisolkonzentrationen, ähnlich dem Basallevel gemessen. Dies deckt sich mit GRECO und STABENFELDT (2013) die für die biologische Halbwertszeit von Cortisol 60 min angaben. Maximale Serum- und Speichelcortisolspiegel wurden in dieser Gruppe zum Zeitpunkt der dritten

Blutentnahme (60 min-Wert) erreicht, danach sanken die mittleren Cortisolkonzentrationen trotz dieser weiteren Venenpunktion ab und erreichten 120 min nach der ersten Blutentnahme wieder Basalniveau (kein signifikanter Unterschied zum Basalwert). Die Cortisolspiegel der Kontrollgruppe dienten als Maß der Belastung durch eine Blutprobenentnahme aus der *Vena jugularis externa*. Dies deckte sich mit der Studie von LANGHOFF (2008), die bei ihren Handlingtieren bei Durchführung eines ähnlichen Beprobungsplanes eine Beeinflussung durch Fixation und Blutentnahme beobachtete. Ähnliches wurde auch in anderen Studien nach wiederholter Venenpunktion beobachtet (SYLVESTER et al., 1998; MELLOR und STAFFORD, 2000; MELLOR et al., 2002). SYLVESTER et al. (1998) gewannen von Kälbern einer Kontrollgruppe in ähnlichem Intervall Blut per Venenpunktion und beobachteten zunächst auch einen geringgradigen Anstieg der Cortisolkonzentration durch Handling und Beprobung. Innerhalb einer Stunde erlangte der Cortisolwert wieder Basallevel. Die kurzfristige Cortisolkonzentrationserhöhung führten sie auf die ungewohnte Situation zurück (SYLVESTER et al., 1998) an die sich die Tiere gewöhnten (MELLOR und STAFFORD, 2000; MELLOR et al., 2002). Bezug nehmend auf diese Studien kann man von einem ähnlichen Effekt in der eigenen Studie ausgehen.

## **1.2. Fixierung in der Oberkieferschlinge**

Eine Fixierung in der Oberkieferschlinge gewährleistet eine ausreichende Ruhigstellung von Schweinen zu diagnostischen Maßnahmen (PLONAIT, 2004). Zur Belastung, die durch diese Zwangsmaßnahme verursacht wird, wurden bereits Studien mit unterschiedlichen Stressindikatoren durchgeführt. NEUBERT et al. (1996) zeigten, dass neben der Lactat- die Katecholaminmessung geeignet ist um den Grad und Zeitpunkt der körperlichen Anstrengung zu bestimmen. Neben Katecholaminen empfahlen ROOZEN et al. (1995) Beta-Endorphine und Cortisol als geeigneten Nachweis von kurzzeitigem Stress, ausgelöst durch das Halten der Schweine in der Oberkieferschlinge. Außerdem zeigten COOK et al. (1996) in ihrer Studie sowohl die Eignung von Speichelcortisol als Stressparameter als auch eine starke Korrelation zwischen Serum- und Speichelcortisol. Für diese Untersuchung wurden die Schweine jeweils fünf Minuten in der Oberkieferschlinge fixiert und anschließend für 30 min in fünfminütigem Abstand Blut über einen Venenverweilkatheter und Speichel durch freiwilliges Kauen auf

einem Wattetupfer gewonnen (COOK et al., 1996). Gegenteilig zur eigenen Untersuchung, die sowohl maximale mittlere Serum- als auch Speichelcortisolspiegel 60 min nach Fixierung nachwies, wurden bei COOK et al. (1996) maximale Cortisolspiegel schon fünf Minuten nach Loslösen aus der Oberkieferschlinge gemessen. Des Weiteren beruhigten sich die Schweine bei COOK et al. (1996) bereits nach 30 min und wiesen zu diesem Zeitpunkt zum Basalwert vergleichbare Serum- und Speichelcortisolspiegel auf. Demgegenüber sanken die mittleren Serumcortisolspiegel in der eigenen Arbeit erst nach 60 min ab. Dies stimmte mit den Ergebnissen von MERLOT et al. (2011) überein, die ebenfalls ein Absinken der Serum- und Speichelcortisolkonzentration 60 min nach fünfminütiger Fixierung in der Oberkieferschlinge beobachteten. In der vorliegenden Arbeit erreichten weder die mittleren Serum- noch die Speichelcortisolkonzentrationen 90 min nach Halten in der Oberkieferschlinge den Basalwert, entgegen der Beobachtungen von MERLOT et al. (2011), deren Tiere nach 90 min zum Basalwert vergleichbare mittlere Serum- und Speichelcortisolkonzentrationen aufwiesen. Allerdings sollte beim Vergleich der Studien die unterschiedliche Dauer der Fixierung in der Oberkieferschlinge beachtet werden. Im Gegensatz zur eigenen Arbeit mit einminütiger Fixierung in der Oberkieferschlinge wurden die Tiere bei COOK et al. (1996) und MERLOT et al. (2011) für fünf Minuten in der Oberkieferschlinge gehalten. In weiteren Versuchen zeigten RUSHEN und LADEWIG (1991), dass Schweine, die 15 Minuten in der Oberkieferschlinge gehalten wurden endogene Opioide freisetzten und dies zu einer vorübergehenden Hypoalgesie führte und die Stressantwort auf die vorausgegangene Bewegungseinschränkung abmilderte (RUSHEN und LADEWIG, 1991). Durch diesen Effekt könnte es auch in der eigenen Studie zu einer Reduzierung der Cortisolfreisetzung nach der Fixierung in der Oberkieferschlinge gekommen sein. Dies stimmt auch mit den Ergebnissen von PHOGAT und PARVIZI (2007) überein, in deren Studie es ebenfalls zur Verminderung der Stressantwort durch endogene Opioide kam.

### **1.3. Nasentupferentnahme**

In der vorliegenden Studie unterschieden sich die mittleren Serum- und Speichelcortisolkonzentrationen nach Nasentupferentnahme (NT) zu keinem Zeitpunkt signifikant von denen der TBA und OK Gruppe. Im Gegensatz zu Tieren bei denen eine Tracheobronchialabstrichentnahme durchgeführt wurde und

die ihr Maximum 30 min nach dem Eingriff erreichten, stiegen die mittleren Serum- und Speichelcortisolspiegel der Tiere, bei denen ein Nasentupfer durchgeführt wurde bis 60 min nach dem Eingriff an. Es gilt zu berücksichtigen, dass das nozizeptive System in einen peripheren und zentralen Anteil, zu dem unter anderem der somatosensorische Kortex zählt, gegliedert ist (PFANNKUCHE, 2008). Bezug nehmend auf GASTL et al. (2014), die für die nasale Mukosa eine eigenständige Projektion auf dem somatosensorischen Kortex nachgewiesen haben, kann vermutet werden, dass diese starke Repräsentation auch in der vorliegenden Studie zu einer länger andauernden Reizantwort führte. Zusammen mit dem Thalamus ist der somatosensorische Kortex, der einen Teil der Großhirnrinde darstellt laut ILLES und ALLGAIER (2013) für die bewusste Schmerzempfindung sowie die Lokalisation und die Registrierung der Stärke von Schmerzen zuständig. Ferner wirkt sich ein schmerzhafter Stimulus auf das spinoreticulothalamische System mit einer Erhöhung des Wachzustandes aus (ILLES und ALLGAIER, 2013). Außerdem führen laut SÖRÖS et al. (2001) schmerzhaft Reize bereits nach wenigen Minuten zu einer örtlichen Umstrukturierung der somatosensorischen Großhirnrinde. Es kommt dabei zu einer Überempfindlichkeit somatotopisch benachbarter Regionen (SÖRÖS et al., 2001). Durch die Untersuchung der Großhirnrinde konnten CRANER und RAY (1991) zeigen, dass das Rostrum bei neonaten Schweinen sehr ausgeprägt somatotopisch repräsentiert und benachbart zur Region von Gesicht und Maul auf dem Kortex lokalisiert ist. Dies deckt sich mit den Beobachtungen der eigenen Studie, in der die mittleren Serum- und Speichelcortisolkonzentrationen der NT und der OK Gruppe bis zum 60 min-Wert anstiegen und für eine Irritation durch die Eingriffe spricht.

#### **1.4. Tracheobronchialabstrichentnahme**

Für die Durchführung des Tracheobronchialabstriches ist ebenso eine Fixierung in der Oberkieferschlinge nötig wie für die des Nasentupfers. Zu keinem Zeitpunkt der eigenen Untersuchung unterschieden sich die mittleren Speichel- und Serumcortisolkonzentrationen der TBA Gruppe weder von der OK noch von der NT Gruppe signifikant. Bezugnehmend auf die Studie von WIDDICOMBE (1995) könnte die geringere Sensitivität der Rezeptoren in den unteren Atemwegen gegen mechanische Reize, verbunden mit einer zunehmenden Chemosensitivität dafür verantwortlich sein, dass die Stressantwort trotz

Hustenreiz nicht deutlicher ausfällt als für die Anwendung der Oberkieferschlinge und des Nasentupfers. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Anwendung eines Tracheobronchialabstriches nach 30 min eine ähnliche Stressreaktion auslöst wie die Entnahme eines Nasentupfers und es könnte daraus geschlossen werden, dass der Großteil der Belastung von der Immobilisation herrührt. Denn vergleicht man die OK Gruppe mit der TBA Gruppe, so konnte zwischen diesen beiden Gruppen in der vorliegenden Untersuchung 30 min nach dem Eingriff kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Dass eine Immobilisation für Schweine mit Stress verbunden ist, wurde auch von LANGHOFF (2008) nachgewiesen. Demnach waren die mittleren Cortisolkonzentrationen bis zu einer Stunde nach Fixation der Ferkel im Kastrationsbock signifikant zu den Werten vor dieser Maßnahme erhöht (LANGHOFF et al., 2009). Allerdings muss die altersabhängige Reaktion auf Schmerz berücksichtigt werden, nachdem in der eigenen Studie acht Wochen alte Tiere im Gegensatz zu Saugferkeln (LANGHOFF, 2008) untersucht wurden. Bezugnehmend auf die Studie von FANG et al. (2005), die Untersuchungen an zwei, vier und sechs Monate alten Schweinen durchführten, konnte eine erhöhte Schmerzhaftigkeit bei vier Monate alten Schweinen nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit der Beobachtung von CARROLL et al. (2006), dass Handling für Schweine mit zunehmendem Alter belastender wird.

In einer Studie zu Agonisten und Antagonisten des beta-adrenergen Systems konnte gezeigt werden, dass als Folge der Beta-adrenergen Stimulation der Cortisolspiegel ansteigt, allerdings durch einen Antagonisten dieses Systems kaum Einfluss auf die Cortisolbasalsekretion genommen werden kann (PHOGAT und PARVIZI, 2007). Bei gleichzeitiger Betrachtung der mittleren Noradrenalin Spiegel und der mittleren Speichel- und Serumcortisolspiegel der TBA Gruppe, die sich vor und nach dem Eingriff jeweils signifikant unterschieden, ist dieser Effekt nachzuvollziehen. Es wird angenommen, dass eine Katecholaminfreisetzung nach Tracheobronchialabstrichprobenentnahme eine vermehrte Cortisolsekretion nach sich zieht. Dies kann analog auf die Beobachtungen zur Belastung bei Nasentupferprobenentnahmen übertragen werden. Die Überlegungen zur Freisetzung von endogenen Opioiden bei Fixierung mit der Oberkieferschlinge sind auch für die TBA Gruppe anzuwenden, da dabei ebenfalls der Gebrauch der Oberkieferschlinge nötig ist.

### 1.5. Speichelcortisol

Der Teil der Speichelcortisolergebnisse, der mit den Serumcortisolergebnissen übereinstimmt, wurde bereits im Zuge der Diskussion der einzelnen Studiengruppen erläutert. Abweichungen zwischen den beiden Untersuchungsmedien werden im Folgenden besprochen.

Alle vier Gruppen erreichten ihre maximale Speichelcortisolkonzentration 60 min nach dem Eingriff, dagegen wurde die höchste mittlere Serumcortisolkonzentration der TBA Gruppe schon 30 min nach dem Eingriff beobachtet. Ferner war zwar ein numerischer Abfall von der 60 min zur 90 min Messung der Speichelcortisolwerte zu beobachten, aber außer für die TBA Gruppe stellte sich kein signifikanter Abfall der Cortisolkonzentrationen zwischen diesen beiden Beprobungszeitpunkten ein. Überdies kehrte die Kontrollgruppe bezüglich der mittleren Speichelcortisolkonzentration in der vorliegenden Studie nicht zum Basalwert zurück wie dies für die mittlere Serumcortisolkonzentration der Fall war. Dies deckt sich mit der Studie von PARROTT et al. (1989), die ebenfalls eine verspätete sowie abgeschwächte Cortisolantwort im Speichel im Vergleich zum Serum beobachteten. Im Hinblick auf die verzögerte Rückkehr zum Basalwert erzielten BUSHONG et al. (2000) vergleichbare Ergebnisse wie in der vorliegenden Studie. Ähnlich deren Untersuchungen, könnte es auch in der eigenen Arbeit zu einem im Serum festzustellenden Abfall der Gesamtcortisolkonzentration gekommen sein, wovon aber noch ein relativ großer Anteil nicht an Bindungsproteine gebunden wurde und somit weiterhin im Speichel gemessen werden konnte (BUSHONG et al., 2000). BUSHONG et al. (2000) schlussfolgerten, dass Speichelcortisol weniger einen konstanten prozentualen Anteil vom Gesamtcortisol im Plasma widerspiegelt, sondern dass die Höhe des im Speichel gemessenen Cortisols mehr vom ungebundenen Cortisol abhängt als von der Gesamtcortisolkonzentration. Auch ADCOCK et al. (2007) zeigten, dass zwischen Blutcortisolkonzentration und porcinem Corticosteroid-bindendem Globulin (pCBG) ein negativer Zusammenhang besteht. Nach akutem Stress sanken die pCBG, was einen Anstieg des freien Cortisols, das im Speichel gemessen wurde, zur Folge hatte (ADCOCK et al., 2007). Auch vermehrter Stress der Muttersauen während der Trächtigkeit übt einen verminderten Einfluss auf die Konzentrationen des Cortisol-bindenden Globulins der Ferkel aus, was zu einem höheren Spiegel von biologisch aktivem

Cortisol führt (KANITZ et al., 2006).

Entgegen der eigenen Ergebnisse die keinen signifikanten Abfall der Speichelcortisolwerte von der 60 min zur 90 min Messung, außer für die TBA Gruppe, dokumentierten, sank der Speichelcortisolspiegel der mit der Oberkieferschlinge fixierten Tiere bei MERLOT et al. (2011) aber schon nach 30 min ab. Für diese Studie wurden die gleichzeitig erfolgenden Blutproben jedoch über einen Venenverweilkatheter gewonnen. Dessen Benutzung könnte ein früheres Absinken der Speichelcortisolkonzentration ermöglichen, da es zu keiner weiteren Beeinflussung der Tiere durch Venenpunktion kam.

### **1.6. AUC**

Mit Maximalkonzentrationen werden nur Belastungsspitzen wiedergegeben, dies ist aber laut MELLOR und STAFFORD (2004) ebenso wenig sinnvoll wie allein die Dauer einer Belastung zu untersuchen. Daher wurden zur besseren Beurteilung der Gesamtbelastung die gemessenen Konzentrationen einzelner Zeitpunkte summiert und nach BLAND (2009) die Konzentrations-Zeit-Kurven (AUC) berechnet. In der vorliegenden Studie wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der aus den Serumcortisolwerten errechneten AUC zwischen den Gruppen TBA, NT und OK ermittelt. Allerdings unterschied sich der AUC der OK Gruppe für Serumcortisol signifikant von der KO Gruppe. Dieser signifikante Unterschied zwischen der Oberkieferschlingengruppe und der Kontrollgruppe ergab sich für einzelne Vergleiche der Beprobungszeitpunkte nur 30 min nach dem Eingriff. Daraus lässt sich ableiten, dass die Gesamtbelastung für ein Tier bezogen auf den Parameter Serumcortisol für die Eingriffe Tracheobronchialabstrichentnahme, Nasentupferentnahme und Fixierung in der Oberkieferschlinge vergleichbar war und über der Belastung für die Kontrollgruppe lag. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die AUC aus dem Speichelcortisol zwischen den Gruppen nicht signifikant, obwohl 30 min nach dem Eingriff, ebenso wie bei der Serumcortisolkonzentration, ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Oberkieferschlingengruppe bestand. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Speichelcortisolspiegel länger erhöht bleiben als die Serumcortisolspiegel (BUSHONG et al., 2000). Dies hätte bei der Berechnung über die Zeit einen großen Einfluss und verminderte die Unterschiede zwischen den Gruppen. Auch MERLOT et al. (2011) beschrieben größere Schwierigkeiten, signifikante Unterschiede bei der Auswertung von

Speichelcortisol als von Serumcortisol darzustellen, vor allem beim Vergleich einer Gruppe, der ein stresshafter Reiz zugefügt wurde mit einer Kontrollgruppe. Dies führten sie auf einen niedrigeren Anstieg für Speichel- als für Serumcortisol zurück (MERLOT et al., 2011).

## **2. Katecholamine**

Zur Ermittlung der Stress- und Schmerzbelastung wurde Plasma gewonnen und die Noradrenalin- und AdrenalinKonzentrationen bestimmt. Dass Katecholamine geeignet sind, um die Belastung von Schweinen zu ermitteln wurde mehrfach in Studien bestätigt (NEUBERT et al., 1996; LACKNER, 2003; OTTEN et al., 2004; ZIMMERMANN et al., 2011).

### **2.1. Kontrollgruppe**

In der vorliegenden Studie wurden weder für die mittlere Noradrenalin- noch für die AdrenalinKonzentration der Kontrollgruppe signifikante Unterschiede zwischen der ersten und zweiten Blutprobenentnahme beobachtet. Dies spricht für eine Elimination der Katecholamine, die nach der ersten Blutprobe ausgeschüttet wurden bis zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme und stimmt mit MÖSTL (2010) überein, wonach die Halbwertszeiten der Katecholamine sehr kurz sind und zwischen 20 sec und 10 min variieren.

### **2.2. Fixierung in der Oberkieferschlinge**

Eine Untersuchung der Stress- und Schmerzbelastung mittels verschiedenen Parametern, darunter Cortisol und Katecholaminen, wurde bereits von ROOZEN et al. (1995) und NEUBERT et al. (1996) durchgeführt. Beide untersuchten die Effekte, die durch eine kurzfristige Fixation von Schweinen mittels Oberkieferschlinge auftraten und verzeichneten sowohl einen Anstieg der Katecholamin- als auch der Cortisolkonzentrationen. Dies steht im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen bezüglich der NoradrenalinKonzentration, die sich nach der Fixation mittels Oberkieferschlinge nicht signifikant von der Basalkonzentration unterschied. Ferner lag die mittlere NoradrenalinKonzentration der OK Gruppe nach dem Eingriff nicht signifikant über der KO Gruppe. Auch für Adrenalin war kein Anstieg der mittleren Konzentration der OK Gruppe nach dem Eingriff zu verzeichnen. Der mittlere Adrenalin Spiegel lag nach der Fixation sogar signifikant unter dem Basalwert. Allerdings ging die Bestimmung des

Basalwertes in der vorliegenden Studie auch mit einer Beeinflussung der Tiere durch Einfangen, Immobilisierung und Blutentnahme einher. Darum kann der Basalwert in unserer Studie eher als Referenz- und weniger als Ruhewert angenommen werden. In einer anderen Studie wurde in zeitlichem Abstand zur Beprobung ein Venenverweilkatheter platziert, um eine Blutprobenentnahme ohne Beeinflussung der Katecholaminspiegel zu ermöglichen (ROSOCHACKI et al., 2000). In der Gruppe, die nur mit der Oberkieferschlinge fixiert wurde stiegen die Katecholaminkonzentrationen im Gegensatz zu Cortisol, bei dem 30 min nach dem Eingriff ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe zu beobachten war, nicht an. DE BOER et al. (1990) zeigten ebenfalls, dass erhöhte Cortisolspiegel nicht immer mit einem Anstieg von Katecholaminen einhergehen. Umgekehrt bedingen erhöhte Katecholaminspiegel aber eine Aktivierung der HHN-Achse (DE BOER et al., 1990).

### **2.3. Nasentupfer- und Tracheobronchialabstrichentnahme**

Vergleichbar mit den beschriebenen Cortisolergebnissen, konnte bei der vorliegenden Untersuchung ein signifikanter Anstieg der NoradrenalinKonzentration und ein nicht signifikanter Anstieg der AdrenalinKonzentration nach der Durchführung eines Tracheobronchialabstriches beobachtet werden. Die mittlere NoradrenalinKonzentration der TBA Gruppe stieg nach dem Eingriff um das 4,2 fache und für Adrenalin um das 1,2 fache an. Nach Entnahme eines Nasentupfers erreichte der NoradrenalinSpiegel in der vorliegenden Studie das 3,1 fache und Adrenalin blieb auf dem Niveau des Basalwertes. Nach dem Eingriff lagen die mittleren Katecholaminspiegel sowohl der TBA als auch der NT Gruppe signifikant über denen der OK Gruppe. Eine Erklärung dafür könnte sich in humanmedizinischen Studien finden. Beim Menschen wurden umso höhere NoradrenalinSpiegel beobachtet, desto größer das Ausmaß des chirurgischen Traumas war (WILMORE et al., 1976; FRIEDRICH et al., 1999). Die Aktivierung des adrenergen Systems erfolgt durch afferente Signale vom Ort der Läsion (HALTER et al., 1977). Dies dürfte in der vorliegenden Studie nur einen sehr geringen Einfluss ausüben, da mit einer geringgradigen Gewebeschädigung zu rechnen war. Den für die Tracheobronchialabstriche verwendeten Kathetern hafteten nach Benutzung keine Gewebeteile oder Blut an. Auch nach der Entnahme der Nasentupfer kam es zu keinen akuten Blutungen. Die Tupfer zeigten maximal eine rosa Verfärbung, die

im Rahmen der Diagnostik erwünscht ist und wahrscheinlich mit einer geringgradigen Schleimhautirritation einherging.

Der mittlere Adrenalin Spiegel der Tiere, die in der vorliegenden Untersuchung mit der Oberkieferschlinge fixiert wurden, nahm nach dieser Zwangsmaßnahme signifikant ab. Hingegen wurden für die anderen drei Gruppen (TBA, NT, KO) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Adrenalinwerten vor und nach dem Eingriff beobachtet. Eine mögliche Erklärung könnte darauf beruhen, dass die Tiere schon bevor die erste Blutentnahme stattfand unschwellig gestresst waren (MELLOR et al., 2002). Dagegen spricht aber, dass sich auch die basalen Adrenalin Konzentrationen in der vorliegenden Studie zwischen den Gruppen unterschieden. Zwischen der TBA und der OK Gruppe bestand zum Zeitpunkt der ersten Blutprobenentnahme ein signifikanter Unterschied. Da die Tiere randomisiert wurden und nach Gruppen gemischt beprobt wurde, ist ein gruppenspezifischer Stressfaktor vor der ersten Blutentnahme unwahrscheinlich. Bei der Interpretation der Ergebnisse der eigenen Untersuchung muss aber beachtet werden, dass die Adrenalin Spiegel sich vor und nach dem Eingriff kaum veränderten und nur ein signifikanter Abfall der Adrenalin Konzentration nach Fixierung mit der Oberkieferschlinge festgestellt werden konnte. Ferner könnte sich auch die zeitliche Abfolge der Studienmaßnahmen darauf ausgewirkt haben, dass die Adrenalin Konzentrationen bei keiner der Gruppen nach dem Eingriff signifikant anstiegen und für die OK Gruppe nach der Fixierung signifikant sanken. So wurde die Stressantwort, die der Fixierung in der Oberkieferschlinge folgte, bei der Ermittlung der Adrenalin Konzentration aus der Blutprobe, die nach Loslösen des Schweines aus der Fixierung erfolgte, möglicherweise nicht mehr erfasst. Diese Hypothese deckt sich mit den Ergebnissen von OTTEN et al. (2004), die eine sehr kurze Plasmahalbwertszeit für Katecholamine beschreiben und höchste Katecholaminkonzentrationen bereits eine Minute nach Beginn der Fixierung in der Oberkieferschlinge ermittelten. Nach dem Eingriff lag die mittlere Noradrenalin Konzentration der TBA Gruppe numerisch über der NT Gruppe aber es unterschieden sich weder die Plasmaspiegel von Noradrenalin noch die von Adrenalin zwischen der TBA und der NT Gruppe signifikant. Sowohl die Noradrenalin Spiegel der Nasentupfergruppe als auch der Tracheobronchialabstrichgruppe stiegen nach dem Eingriff signifikant zum Basallevel an. Die geringe Veränderung der Adrenalin Spiegel nach den Eingriffen

wurde auch von MELLOR et al. (2002) bei Lämmern nach Kastration und Schwanzkupieren per Gummiring beschrieben. Wohingegen die Noradrenalin Spiegel der Lämmer einen Anstieg verzeichneten, den sie auf ischämischen Schmerz zurückführten (MELLOR et al., 2002). Ähnlich wie in deren Studie wird auch in der vorliegenden Studie davon ausgegangen, dass die Erhöhung der Noradrenalin Spiegel auf eine periphere Sympathikusaktivität zurückgeht (MELLOR et al., 2002). Zur Aktivierung des sympathoadrenergen Systems kommt es in „fight or flight“ Situationen, es unterstützt den Organismus in Zuständen der Hypovolämie, Hypoxie und Hypoglycämie sowie lebensbedrohlichen Schockzuständen (GOLDSTEIN, 1987). Dabei steigt der Adrenalin Spiegel im Gegensatz zur Noradrenalin Konzentration stark an, ebenso wie unter kognitiver Erregung und Angst (DIMS DALE und MOSS, 1980; WARD et al., 1983; SGOIFO et al., 1996; SILBERNAGEL und DESPOPOULUS, 2012c). Noradrenalin als Transmitter der postganglionär-sympathischen Neurone, gibt die neuronale sympathische Aktivität wieder und verändert sich unter solchen Zuständen kaum (GOLDSTEIN, 1987; STARKE, 2013). Diese Ansicht teilten auch KVETNANSKY et al. (1979) wonach die Noradrenalin-Antwort auf Immobilisationsstress hauptsächlich aus den sympathischen Endigungen und nur zu 20% aus den Nebennieren stammt, wohingegen Adrenalin vorwiegend aus dem Nebennierenmark freigesetzt wird (KVETNANSKY et al., 1979). Aktive Abwehr- und Wutreaktionen setzten laut DÖCKE und KEMPER (1994) vor allem Noradrenalin frei. FUKUHARA et al. (1996) stellten steigende Noradrenalin Konzentrationen auch nach Kältestress fest. Bei der eigenen Untersuchung lagen die Noradrenalin Spiegel der NT als auch der TBA Gruppe nach dem Eingriff signifikant über denen der OK Gruppe. Gleichzeitig stiegen die Adrenalin Konzentrationen bei keiner der Gruppen nach dem Eingriff signifikant an, lediglich ein geringer numerischer Anstieg war für die TBA Gruppe zu verzeichnen. Bezugnehmend auf die genannten Studien kam es bei der TBA und NT Gruppe zu einer höheren Freisetzung von Noradrenalin aus den sympathischen Nervenendigungen in der Peripherie als dies für die OK Gruppe der Fall war. Dies spricht für eine größere Belastung durch Immobilisationsstress im Sinne einer Wut- und Abwehrreaktion durch die Probenentnahme mittels Tracheobronchial- und Nasentupfer als für das Halten in der Oberkieferschlinge. Möglicherweise wirkte sich die unterschiedliche Fixierung der Tiere insofern aus, dass die mittleren Katecholaminspiegel sowohl der TBA als auch der NT Gruppe

nach dem Eingriff signifikant über denen der OK Gruppe lagen. Sowohl die Tiere der TBA als auch der NT Gruppe wurden zusätzlich zur Fixierung in der Oberkieferschlinge zwischen den Beinen einer Versuchsperson stehend in der Flankengegend stabilisiert. Bezugnehmend auf LANGHOFF (2008) die eine Stressbelastung von Ferkeln in Folge von Immobilisation beschrieb, könnte die zusätzliche Bewegungseinschränkung der TBA und NT Gruppe nach dem Eingriff zu den signifikant höheren Katecholaminkonzentrationen dieser beiden Gruppen als der OK Gruppe geführt haben. Übereinstimmend beobachteten auch ROOZEN et al. (1995) erhöhte Plasmakonzentrationen von Katecholaminen, Beta-Endorphin und Cortisol nach Immobilisation. Ferner könnte das Einführen des Nasentupfers eine Stimulation des *N. infraorbitalis*, der die Nasenhaut und den Nasenhöhleneingang sensibel innerviert, hervorrufen sowie zu einer zusätzlichen Reizung der sensiblen Nasenschleimhaut, die von zwei unterschiedlichen Ästen des *N. trigeminus* sensibel versorgt wird, führen (NICKEL et al., 2004). Ähnliches dürfte für das Einführen des Tracheobronchialkatheters zutreffen, wodurch es zu Irritationen im Rachen und der Trachea kommen könnte. Bezugnehmend auf DE CARLOS et al. (2013) ist die menschliche Rachenwand mit verschiedenen Rezeptoren ausgestattet, die mechanische Reize der oberen Atemwege aufnehmen. Diese Rezeptoren werden von sensorischen Nerven begleitet (DE CARLOS et al., 2013). Ferner liegen laut SILBERNAGEL und DESPOPOULUS (2012b) Irritationsendigungen in der Bronchialschleimhaut die unter anderem am Hustenreflex beteiligt sind. Der geringgradige Anstieg der AdrenalinKonzentration der TBA Gruppe nach Entnahme des Tracheobronchialtupfers könnte auf den psychologischen Anteil der Belastung hinweisen, wie von DÖCKE und KEMPER (1994) und DIMSDALE und MOSS (1980) beschrieben. Durch das Einbringen des Katheters in die Luftröhre wurden die luftleitenden Wege behindert und zum Teil Husten ausgelöst. Dies könnte zu einer emotionalen Erregung geführt haben. Durch Erhöhung des Atemwiderstandes lösten ALIUS et al. (2013) auch bei Menschen Angst und Unwohlsein sowie physiologische Reaktionen aus. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten darauf hin, dass diese Belastung bei den Tieren der TBA Gruppe vermutlich nur geringgradig ausgeprägt war.

## VI. SCHLUSSFOLGERUNG

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Belastung bei der Entnahme von Tracheobronchialabstrichen vergleichend mit der von Nasentupfern untersucht. Sowohl Cortisol aus Serum als auch aus Speichel bestätigten sich als geeignete Parameter zur Erfassung von Stress- und Schmerzbelastungen nach diagnostischen Maßnahmen beim Schwein. Durch den Einschluss einer Gruppe von Tieren, die in der Oberkieferschlinge gehalten wurden, war eine Aussage über die Belastung in Folge der Fixierung möglich. Die Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) ermöglichte in der vorliegenden Studie eine Beschreibung von Intensität und Dauer der Belastung.

Der Verlauf der Cortisolkonzentrationen nach Entnahme von Tracheobronchialabstrichen entsprach jenem nach Nasentupfern. Ein vergleichbarer wenn auch etwas verzögerter Cortisolanstieg wurde durch die Fixierung mit der Oberkieferschlinge hervorgerufen. Dies deutet darauf hin, dass die bloße Fixation einen bedeutenden Anteil an der Stressantwort des Tieres trägt. Außerdem erwies sich die Auswertung der NoradrenalinKonzentrationen als aussagekräftig. Bezugnehmend auf diese Ergebnisse wurde gezeigt, dass der akute Stress durch einen Tracheobronchialabstrich vergleichbar mit dem einer Nasentupferentnahme war und beide eine wesentlich höhere Belastung als die alleinige Fixierung mit Oberkieferschlinge darstellten. Im Gegensatz dazu waren die Ergebnisse der AdrenalinKonzentrationen weniger aussagekräftig, was zum einen an den divergierenden Basalwerten lag und zum anderen an den geringen Veränderungen der Werte nach dem Eingriff. Die beobachteten Anstiege der Adrenalin Spiegel waren gering und sprechen gegen starken emotionalen Stress und Angst der Schweine in Folge der durchgeführten Maßnahmen. Dieser Parameter ist möglicherweise besser zur Evaluierung anderer Belastungen, die mit Kreislaufbeeinträchtigung einhergehen (GOLDSTEIN, 1987; SILBERNAGEL und DESPOPOULUS, 2012c) geeignet und erfordert Blutprobenentnahmen mittels Venenverweilkatheter. Entzündungsmediatoren (Prostaglandine, Bradykinine etc.) sensibilisieren laut HENKE und ERHARDT (2001) die Schmerzrezeptoren und erniedrigen die Schmerzschwelle. Dies ist für die Beprobung von Tieren in der Praxis zu bedenken, denn die zu untersuchenden Tiere leiden häufig bereits unter einer Vorschädigung, z.B. Atemwegserkrankung.

Darum könnten die Tracheobronchialabstriche und Nasentupfer für erkrankte Schweine eventuell belastender sein als für gesunde Tiere, die in der vorliegenden Studie untersucht wurden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Entnahme von Tracheobronchialabstrichen bei klinisch gesunden Schweinen zu einer Belastung vergleichbar mit der Entnahme von Nasentupfern führt. Verglichen zur alleinigen Fixierung mit der Oberkieferschlinge führt sie zu einer deutlich ausgeprägteren kurzfristigen Stressantwort.

## VII. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Belastung für Schweine bei der Entnahme eines Tracheobronchialabstriches (TBA) mit der Entnahme eines Nasentupfers (NT) und mit dem alleinigen Halten in der Oberkieferschlinge (OK) zu vergleichen. Zur Evaluierung der Stressbelastung dienten Cortisolkonzentrationen aus Serum- und Speichelproben sowie aus dem Blutplasma ermittelte Noradrenalin- und Adrenalinkonzentrationen. Hierfür wurden vier Gruppen, drei Versuchs- und eine Kontrollgruppe (KO), zu je 23 klinisch gesunden Tieren für die Cortisolbestimmungen und zu je 31 klinisch gesunden Tieren für die Katecholaminbestimmungen untersucht. Von in der Oberkieferschlinge fixierten Tieren der TBA und NT Gruppe wurde ein Tracheobronchialabstrich bzw. ein Nasentupfer entnommen. Der Tracheobronchialkatheter wurde ohne vorherige Narkose der Tiere in die Luftröhre eingeführt. Bei den Tieren der OK Gruppe erfolgte eine Fixierung in der Oberkieferschlinge für die Dauer von 60 Sekunden. Im Gegensatz dazu wurden die Tiere der KO Gruppe zum Zeitpunkt des Eingriffes ohne Beunruhigung in der Bucht belassen. Im ersten Teilversuch, welcher der Cortisolbestimmung diente, wurde von jedem Schwein viermal Blut und zum selben Zeitpunkt Speichel gewonnen: 30 min vor dem Eingriff sowie je 30 min, 60 min und 90 min danach. Die Katecholaminkonzentrationen wurden im zweiten Teilversuch aus EDTA-Blutproben, die 15 min vor und unmittelbar nach dem Eingriff entnommen wurden, ermittelt.

Die mittleren Serum- und Speichelcortisolkonzentrationen der Gruppen TBA, NT und OK stiegen 30 min nach dem Eingriff signifikant zum Basalwert an. Zu diesem Zeitpunkt war bei mittels Oberkieferschlinge fixierten Tieren (OK) eine signifikant höhere Cortisolkonzentration als bei Tieren der Kontrollgruppe (KO) messbar. Ein signifikanter Unterschied der Cortisolkonzentrationen in Serum und Speichel konnte weder 30 min, 60 min noch 90 min nach den verschiedenen Eingriffen (TBA, NT und OK) zwischen den Versuchsgruppen ermittelt werden. Die mittleren Serum- und Speichelcortisolkonzentrationen der drei Versuchsgruppen (TBA, NT und OK) sanken zum 90 min-Wert ab. In Bezug auf die Konzentrations-Zeit-Kurven (AUC) unterschieden sich die Serum- und Speichelcortisolkonzentrationen zwischen den Gruppen TBA, OK und NT nicht

signifikant. Die NoradrenalinKonzentrationen stiegen nach Tracheobronchialabstrich und Nasentupfer signifikant zum Basalwert an, ohne sich signifikant voneinander zu unterscheiden. Die mittleren NoradrenalinKonzentrationen der OK Gruppe und der KO Gruppe blieben auf signifikant niedrigerem Niveau. Der Adrenalin Spiegel der TBA Gruppe stieg unmittelbar nach dem Eingriff geringgradig an, wohingegen die mittlere AdrenalinKonzentration der Tiere der NT Gruppe vor und nach dem Eingriff gleich blieb und die der OK Gruppe nach dem Eingriff sank. Die mittleren AdrenalinKonzentrationen der TBA und NT Gruppe unterschieden sich nach den Eingriffen nicht signifikant voneinander.

Die CortisolKonzentrationen nach Durchführung eines Tracheobronchialabstriches entsprechen denen nach Entnahme eines Nasentupfers. Ein vergleichbarer wenn auch etwas verzögerter Cortisolanstieg wird durch die Fixierung mit der Oberkieferschlinge hervorgerufen. Bezugnehmend auf die Noradrenalin-Ergebnisse der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass der kurzfristige Stress durch die Tracheobronchialabstriche vergleichbar mit der Nasentupferentnahme ist und beide eine wesentlich höhere Belastung als die alleinige Fixierung mit der Oberkieferschlinge darstellen. Die insgesamt beobachteten Veränderungen der Adrenalin Spiegel sind gering und sprechen gegen starken emotionalen Stress und Angst der Schweine nach den durchgeführten Maßnahmen.

## VIII. SUMMARY

The aim of the present study was to compare stress in pigs resulting from tracheo-bronchial swabbing compared to nasal swabbing and to fixation in a snare without sampling. In order to evaluate the stress, cortisol concentrations from serum and saliva-samples as well as epinephrine and norepinephrine concentrations from plasma samples have been used. Four groups, three study and one control group, of clinically healthy animals were formed to measure cortisol (each group  $n = 23$ ) and catecholamines (each group  $n = 31$ ). A tracheo-bronchial swab was taken from animals of the TBA group (tracheo-bronchial swabbing) during fixation with a snare. The animals were not anaesthetised for the tracheo-bronchial swabbing. Animals from the NT group (nasal swabbing) were fixated in the same way, but a nasal swab was taken. Animals of the OK group (fixation in a snare) were restrained for 60 sec with a snare without swabbing. The animals of the control group were left in their pen without any disturbance. In the first part of the study we looked at cortisol levels in blood and saliva. Blood and saliva samples were taken simultaneously at the following time points: 30 min before manipulation and 30 min, 60 min and 90 min afterwards. In the second part of the study we tested catecholamine levels in plasma samples taken 15 min before and directly after the manipulation.

30 min after the manipulation, average cortisol levels in serum and saliva in the study groups (TBA, NT, OK) were significantly higher than the baseline value. At this point the average cortisol levels of the animals that were only fixated without swabbing (OK) were significantly higher than those of the animals in the control group (KO). There was no significant difference in serum or saliva cortisol levels between the study groups (TBA, NT, OK) at any point after the manipulation. 90 min after the manipulation the average cortisol levels in saliva and serum decreased in all three study groups (TBA, NT, OK). The concentration-time-curves (AUC) of the study groups (TBA, NT, OK) did not significantly differ from each other neither in serum nor in saliva. In both groups where swabs were taken, either tracheo- bronchial (TBA) or nasal (NT), norepinephrine levels after the manipulation were significantly elevated compared to the baseline value. They did not differ significantly between each other though. The average norepinephrine levels of the groups, where no swabs were taken (OK, KO), were

significantly lower. We could observe a slight increase in the epinephrine levels of the TBA group directly after the manipulation, whereas average epinephrine concentrations of the NT group stayed on a constant level before and after the manipulation and epinephrine concentrations of the OK group decreased. However, the average epinephrine levels of the TBA and NT groups after the manipulation did not significantly differ from each other.

In conclusion, cortisol levels after tracheo-bronchial swabbing are comparable to that after nasal swabbing. The third study group which was only fixated by snare (OK) showed the same cortisol increase with a little delay. Concerning the norepinephrine levels that we measured in our study, we could show that the short-term stress after tracheo-bronchial swabbing is comparable to the short-term stress after nasal swabbing. Both manipulations caused significantly higher short-term stress than fixation with the snare alone. In general, the observed changes in the epinephrine levels are only small and do not indicate major distress in the animals after any of the performed manipulations.

## IX. LITERATURVERZEICHNIS

Adcock RJ, Kattesh HG, Roberts MP, Carroll JA, Saxton AM, Kojima CJ. Temporal relationships between plasma cortisol, corticosteroid-binding globulin (CBG), and the free cortisol index (FCI) in pigs in response to adrenal stimulation or suppression. *Stress-the International Journal on the Biology of Stress* 2007; 10: 305-310.

Alius MG, Pané-Farré CA, Von Leupoldt A, Hamm AO. Induction of dyspnea evokes increased anxiety and maladaptive breathing in individuals with high anxiety sensitivity and suffocation fear. *Psychophysiology* 2013; 50: 488-497.

Axelrod J, Reisine TD. Stress hormones-their interaction and regulation. *Science* 1984; 224: 452-459.

Barnett JL, Winfield CG, Cronin GM, Makin AW. Effects of photoperiod and feeding on plasma corticosteroid concentrations and maximum corticosteroid-binding capacity in pigs. *Australian Journal of Biological Sciences* 1981; 34: 577-585.

Blanchard B, Vena MM, Cavalier A, Lelannic J, Gouranton J, Kobisch M. Electron-microscopic observation of the respiratory-tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 1992; 30: 329-341.

Bland JM. *An introduction to medical statistics*. 2009. Oxford University Press, Oxford. 169-171.

Brooks J, Tracey I. Review: From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways. *Journal of Anatomy* 2005; 207: 19-33.

Broom DM. The evolution of pain. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 2001; 70: 17-21.

Budras K-D, Buda S. Atlas der Anatomie des Rindes. 2002. Schlütersche, Hannover.

Buer H. Nasentupfer/Trachealspülung. In: NutztierSkills: Arbeitstechniken in der Großtierpraxis: Rind, Schwein, Ziege. 2012. ed: Palzer A, Buer H. Schattauer, Stuttgart. 58-59.

Bushong DM, Friend TH, Knabe DA. Salivary and plasma cortisol response to adrenocorticotropin administration in pigs. *Laboratory Animals* 2000; 34: 171-181.

Canning BJ, Mazzone SB, Meeker SN, Mori N, Reynolds SM, Undem BJ. Identification of the tracheal and laryngeal afferent neurones mediating cough in anaesthetized guinea-pigs. *Journal of Physiology-London* 2004; 557: 543-558.

Carroll JA, Berg EL, Strauch TA, Roberts MP, Kattesh HG. Hormonal profiles, behavioral responses, and short-term growth performance after castration of pigs at three, six, nine, or twelve days of age. *Journal of Animal Science* 2006; 84: 1271-1278.

Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders: Overview of physical and behavioral homeostasis. *Journal of the American Medical Association* 1992; 267: 1244-1252.

Chrousos GP, McCarty R, Pacak K, Cizza G, Sternberg E, Gold PW, Kvetnansky R. Stress: Basic mechanisms and clinical implications. 1995. New York Academy of Sciences, New York. 755.

Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology* 2009; 5: 374-381.

Cook NJ, Schaefer AL, Lepage P, Jones SM. Salivary vs. serum cortisol for the assessment of adrenal activity in swine. *Canadian Journal of Animal Science* 1996; 76: 329-335.

Cook NJ. Review: Minimally invasive sampling media and the measurement of corticosteroids as biomarkers of stress in animals. *Canadian Journal of Animal Science* 2012; 92: 227-259.

Cook NJ, Hayne SM, Rioja-Lang FC, Schaefer AL, Gonyou HW. The collection of multiple saliva samples from pigs and the effect on adrenocortical activity. *Canadian Journal of Animal Science* 2013; 93: 329-333.

Craner SL, Ray RH. Somatosensory cortex of the neonatal pig. 1. Topographic organization of the primary somatosensory cortex (SI) *Journal of Comparative Neurology* 1991; 306: 24-38.

Dantzer R, Arnone M, Mormede P. Effects of frustration on behaviour and plasma corticosteroid levels in pigs. *Physiology & Behavior* 1980; 24: 1-4.

De Boer SF, Slangen JL, Van der Gugten J. Plasma catecholamine and corticosterone levels during active and passive shock-prod avoidance behavior in rats: effects of chlordiazepoxide. *Physiology & Behavior* 1990; 47: 1089-1098.

De Carlos F, Cobo J, Macias E, Feito J, Cobo T, Calavia MG, Garcia-Suarez O, Vega JA. The sensory innervation of the human pharynx: searching for mechanoreceptors. *Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 2013; 296: 1735-1746.

De Jong IC, Prella IT, Van de Burgwal JA, Lambooij E, Korte SM, Blokhuis HJ, Koolhaas JM. Effects of environmental enrichment on behavioral responses to novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs. *Physiology & Behavior* 2000; 68: 571-578.

Dimsdale JE, Moss J. Plasma-catecholamines in stress and exercise. *Journal of the American Medical Association* 1980; 243: 340-342.

Döcke F, Kemper A. Nebennierenmark. In: *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. 1994. ed: Döcke F. Gustav Fischer Verlag, Jena. 357-378.

Ekkel ED, Dieleman SJ, Schouten WGP, Portela A, Cornélissen G, Tielen MJM, Halberg F. The circadian rhythm of cortisol in the saliva of young pigs. *Physiology & Behavior* 1996; 60: 985-989.

Ekkel ED, Savenije B, Schouten WGP, Wiegant VM, Tielen MJM. The effects of mixing on behavior and circadian parameters of salivary cortisol in pigs. *Physiology & Behavior* 1997; 62: 181-184.

Erhardt W, Henke J, Haberstroh J, Baumgartner C, Tacke S. Patienten mit eingeschränkter respiratorischer Funktion. In: *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier: mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. 2011. ed: Erhardt W, Henke J, Baumgartner C. Schattauer, Stuttgart. 485-499.

Escribano D, Soler L, Gutierrez AM, Martinez-Subiela S, Ceron JJ. Measurement of chromogranin A in porcine saliva: validation of a time-resolved immunofluorometric assay and evaluation of its application as a marker of acute stress. *Animal* 2013; 7: 640-647.

Evans FD, Christopherson RJ, Aherne FX. Development of the circadian rhythm of cortisol in the gilt from weaning until puberty. *Canadian Journal of Animal Science* 1988; 68: 1105-1111.

Fablet C, Marois C, Kobisch M, Madec F, Rose N. Estimation of the sensitivity of four sampling methods for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in live pigs using a Bayesian approach. *Veterinary Microbiology* 2010; 143: 238-245.

Fang M, Lorke DE, Li J, Gong X, Yew JCC, Yew DT. Postnatal changes in functional activities of the pig's brain: a combined functional magnetic resonance imaging and immunohistochemical study. *Neurosignals* 2005; 14: 222-233.

Flasshoff J. Ein praxisrelevantes Verfahren zur frühzeitigen Differenzierung bakterieller Bronchopneumonieerreger beim Schwein mittels Bronchiallavage (BAL). *Der Praktische Tierarzt* 1996; 77: 1020-1024.

Friedrich M, Rixecker D, Friedrich G. Evaluation of stress-related hormones after surgery. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology* 1999; 26: 71-75.

Fukuhara K, Kvetnansky R, Weise VK, Ohara H, Yoneda R, Goldstein DS, Kopin IJ. Effects of continuous and intermittent cold (SART) stress on sympathoadrenal system activity in rats. *Journal of Neuroendocrinology* 1996; 8: 65-72.

Gallagher NL, Giles LR, Wynn PC. The development of a circadian pattern of salivary cortisol secretion in the neonatal piglet. *Biology of the Neonate* 2002; 81: 113-118.

Gastl M, Brunner YF, Wiesmann M, Freiherr J. Depicting the inner and outer nose: the representation of the nose and the nasal mucosa on the human primary somatosensory cortex (SI). *Human Brain Mapping* 2014; 35: 4751-4766.

Goldstein DS. 2-Stress-induced activation of the sympathetic nervous system. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 1987; 1: 253-278.

Goodell CK, Prickett J, Kittawornrat A, Zhou F, Rauh R, Nelson W, O'Connell C, Burrell A, Wang C, Yoon K-J, Zimmerman JJ. Probability of detecting influenza A virus subtypes H1N1 and H3N2 in individual pig nasal swabs and pen-based oral fluid specimens over time. *Veterinary Microbiology* 2013; 166: 450-460.

Greco D, Stabenfeldt GH. Endocrinology. In: *Textbook of Veterinary Physiology*. 2013. ed: Cunningham JG. W.B. Saunders Company, Pennsylvania. 359-406.

Grosse Beilage E, Nathues H, Grummer B, Hartung J, Kamphues J, Kietzmann M, Rohde J, Spindler B, Weissenböck H. Diagnostik, Prophylaxe und Therapie von Atemwegserkrankungen in Schweinebeständen. In: Diagnostik und Gesundheitsmanagement im Schweinebestand: Band 1. 2013. ed: Grosse Beilage E, Wendt M. Eugen Ulmer, Stuttgart. 200-270.

Halter JB, Pflug AE, Porte D. Mechanism of plasma catecholamine increases during surgical stress in man. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1977; 45: 936-944.

Henke J, Erhardt W. Schmerzmanagement bei Klein-und Heimtieren. 2001. Enke Verlag, Stuttgart. 2-31.

Hennig-Pauka I, Bremerich S, Nienhoff H, Schroder C, Ganter M, Blecha F, Waldmann KH, Gerlach GF. Methods of lung lavage in pigs - a comparison. *Der Praktische Tierarzt* 2008; 89: 505-511.

Hillmann E, Schrader L, Mayer C, Gygax L. Effects of weight, temperature and behaviour on the circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs. *Animal* 2008; 2: 405-409.

Hjemdahl P. Plasma catecholamines-analytical challenges and physiological limitations. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 1993; 7: 307-353.

Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* 1979; 6: 65-70.

Höltig D, Hennig-Pauka I. Bestandsproblem Atemwegserkrankungen. *Der Praktische Tierarzt* 2013; Sonderheft von *Der Praktische Tierarzt*: Bestandsbetreuung Rind und Schwein: 40-44.

Illes P, Allgaier C. Analgetika. In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 2013. ed: Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K. Urban & Fischer, 207-213.

Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001; 413: 203-210.

Kanitz E, Otten W, Tuchscherer M. Changes in endocrine and neurochemical profiles in neonatal pigs prenatally exposed to increased maternal cortisol. *Journal of Endocrinology* 2006; 191: 207-220.

Kattesh HG, Charles SF, Baumbach GA, Gillespie BE. Plasma cortisol distribution in the pig from birth to six weeks of age. *Neonatology* 1990; 58: 220-226.

Klemcke HG, Nienaber JA, Hahn GL (1989) Plasma adrenocorticotrophic hormone and cortisol in pigs: effects of time of day on basal and stressor-altered concentrations. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. New York. 42-53

König HE, Liebich H-G. Atmungsapparat. In: Anatomie der Haussäugetiere. 2012. ed: König HE, Liebich H-G. Schattauer, Stuttgart. 367-388.

König HE, Misek I, Mülling C, Seeger J, Liebich H-G. Nervensystem. In: Anatomie der Haussäugetiere. 2012. ed: König HE, Liebich H-G. Schattauer, Stuttgart. 485-557.

Kurth KT, Hsu T, Snook ER, Thacker EL, Thacker BJ, Minion EC. Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2002; 14: 463-469.

Kvetnansky R, Sun C, Lake C, Thoa NB, Torda T, Kopin IJ. Effect of handling and forced immobilization on rat plasma levels of epinephrine, norepinephrine, and dopamine- $\beta$ -hydroxylase. *Endocrinology* 1978; 103: 1868-1874.

Kvetnansky R, Weise V, Thoa NB, Kopin IJ. Effects of chronic guanethidine treatment and adrenal medullectomy on plasma levels of catecholamines and corticosterone in forcibly immobilized rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1979; 209: 287-291.

Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M. Catecholaminergic Systems in Stress: Structural and Molecular Genetic Approaches. *Physiological Reviews* 2009; 89: 535-606.

Kvetnansky R, Ukropec J, Laukova M, Manz B, Pacak K, Vargovic P. Stress Stimulates Production of Catecholamines in Rat Adipocytes. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2012; 32: 801-813.

Lackner A. Untersuchungen zur Schmerzhaftigkeit und der Wundheilung bei der Kastration männlicher Ferkel zu unterschiedlichen Kastrationszeitpunkten. Diss. med. vet. 2003. Ludwig-Maximilians-Universität, München

Langhoff R. Untersuchungen über den Einsatz von Schmerzmitteln zur Reduktion kastrationsbedingter Schmerzen beim Saugferkel. Diss. med. vet. 2008. Ludwig-Maximilians-Universität, München

Langhoff R, Zöls S, Barz A, Palzer A, Ritzmann M, Heinritzi K. Untersuchungen über den Einsatz von Schmerzmitteln zur Reduktion kastrationsbedingter Schmerzen beim Saugferkel. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 2009; 122: 325-332.

Lendl C, Henke J. Anästhesien zu diagnostischen und therapeutischen Verfahren. In: *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier*. 2011. ed: Erhardt W, Henke J, Haberstroh J, Baumgartner C, Tacke S. Schattauer, Stuttgart. 499-515.

Löscher W, Frey HH. Zentrales Nervensystem (ZNS). In: Physiologie der Haustiere. 2010. ed: Von Engelhardt W, Breves G. Enke Verlag, Stuttgart. 45-71.

Marois C, Le Carrou J, Kobisch M, Gautier-Bouchardon AV. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. *Veterinary Microbiology* 2007; 120: 96-104.

Mellor D, Cook C, Stafford K. Quantifying some responses to pain as a stressor. In: *The Biology of Animal Stress*. 2000. ed: Moberg G, Mench J. CABI Publishing, Cambridge. 171-198.

Mellor D, Stafford K. Physiological and behavioural assessment of pain in ruminants: principles and caveats. *Alternatives to laboratory animals* 2004; 32: 267-271.

Mellor DJ, Stafford KJ. Acute castration and/or tailing distress and its alleviation in lambs. *New Zealand Veterinary Journal* 2000; 48: 33-43.

Mellor DJ, Stafford KJ, Todd SE, Lowe TE, Gregory NG, Bruce RA, Ward RN. A comparison of catecholamine and cortisol responses of young lambs and calves to painful husbandry procedures. *Australian Veterinary Journal* 2002; 80: 228-233.

Merlot E, Mounier AM, Prunier A. Endocrine response of gilts to various common stressors: a comparison of indicators and methods of analysis. *Physiology & Behavior* 2011; 102: 259-265.

Mohr E. Biologische Rhythmen. In: *Physiologie der Haustiere*. 2010. ed: Von Engelhardt W, Breves G. Enke Verlag, Stuttgart. 673-677.

Moorkamp L, Nathues H, Spargser J, Tegeler R, Grosse Beilage E. Detection of respiratory pathogens in porcine lung tissue and lavage fluid. *The Veterinary Journal* 2008; 175: 273-275.

Mormede P, Andanson S, Auperin B, Beerda B, Guemene D, Malmkvist J, Manteca X, Manteuffel G, Prunet P, van Reenen CG, Richard S, Veissier I. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology & Behavior* 2007; 92: 317-339.

Möstl E. Spezielle Endokrinologie. In: *Physiologie der Haustiere*. 2010. ed: Von Engelhardt W, Breves G. Enke Verlag, Stuttgart. 515-579.

Nathues H, Grosse Beilage E. Für Studium und Praxis: Diagnostik und Bekämpfung der Enzootischen Pneumonie beim Schwein. *Tierärztliche Praxis Ausgabe Großtiere/Nutztiere* 2009; 37: 134-141.

Neubert E, Gurtler H, Vallentin G. Effect of restraining growth pigs with snare restraints on plasma levels of catecholamines, cortisol, insulin and metabolic parameters. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 1996; 109: 409-413.

Nickel R, Schummer A, Seiferle E. Peripheres Nervensystem. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. 2004. ed: Nickel R, Schummer A, Seiferle E. Parey, Stuttgart. 228-384.

Nienhoff H, Staszyk C, Mumme J. Beschreibung eines praktikablen Verfahrens zur Gewinnung von Lungenspülproben bei Schweinen im schweinehaltenden Betrieb. *Der Praktische Tierarzt* 2006; 87: 138-140.

Otten W, Kanitz E, Puppe B, Tuchscherer M, Brussow KP, Nurnberg G, Stabenow B. Acute and long term effects of chronic intermittent noise stress on hypothalamic-pituitary-adrenocortical and sympathoadrenomedullary axis in pigs. *Animal Science* 2004; 78: 271-283.

Otten W, Kanitz E, Tuchscherer M, Grabner M, Nurnberg G, Bellmann O, Hennig U, Rehfeldt C, Metges CC. Effects of low and high protein: carbohydrate ratios in the diet of pregnant gilts on maternal cortisol concentrations and the adrenocortical and sympathoadrenal reactivity in their offspring. *Journal of Animal Science* 2013; 91: 2680-2692.

Palzer A. Keimspektrum und Erregerassoziationen bei gesunden und an Pneumonie erkrankten Schweinen. Diss. med. vet. 2006. Ludwig-Maximilians-Universität, München

Parrott RF, Misson BH. Changes in pig salivary cortisol in response to transport simulation, food and water deprivation, and mixing. *British Veterinary Journal* 1989; 145: 501-505.

Parrott RF, Misson BH, Baldwin BA. Salivary cortisol in pigs following adrenocorticotrophic hormone stimulation-comparison with plasma-levels. *British Veterinary Journal* 1989; 145: 362-366.

Pausenberger A, Mues G, Nienhoff H, Strutzberg-Minder K. Vergleich der Untersuchungsergebnisse von bronchoalveolären Lavageproben mit Bronchialtupferproben (Tracheobronchialabstrichproben) mittels PCR in einem Ferkelerzeugerbetrieb. *Der Praktische Tierarzt* 2012; 93: 440-447.

Pausenberger A, Elsbecker C, Wilkes M, Beckmann H. Studie zur kulturell-bakteriologischen Untersuchung von Bronchialabstrichproben und Vergleich mit PCR-Ergebnissen. *Der Praktische Tierarzt* 2013; 94: 912-917.

Peers A, Mellor DJ, Wintour EM, Dodic M. Blood pressure, heart rate, hormonal and other acute responses to rubber-ring castration and tail docking of lambs. *New Zealand Veterinary Journal* 2002; 50: 56-62.

Pfannkuche H. Nozizeption und Schmerz: neurophysiologische Grundlagen. *Tierärztliche Praxis Ausgabe Kleintiere* 2008; 36: 5-11.

Phogat JB, Parvizi N. Beta-adrenergic and opioidergic modulation of cortisol secretion in response to acute stress. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes: official journal, German Society of Endocrinology and German Diabetes Association* 2007; 115: 354-359.

Plonait H. Umgang mit Schweinen, Zwangsmaßnahmen und Operationsvorbereitung. In: *Lehrbuch der Schweinekrankheiten*, 4 edn. 2004. ed: Waldmann KH, Wendt M. Parey Verlag, Stuttgart. 39-49.

Roozen AW, Tsuma VT, Magnusson U. Effects of short-term restraint stress on plasma concentrations of catecholamines, beta-endorphin, and cortisol in gilts. *American journal of veterinary research* 1995; 56: 1225-1227.

Rosochacki SJ, Piekarczywska AB, Poloszynowicz J, Sakowski T. The influence of restraint immobilization stress on the concentration of bioamines and cortisol in plasma of Pietrain and Duroc pigs. *Journal of veterinary medicine A* 2000; 47: 231-242.

Ruis MAW, Te Brake JHA, Engel B, Ekkel ED, Buist WG, Blokhuis HJ, Koolhaas JM. The Circadian Rhythm of Salivary Cortisol in Growing Pigs: Effects of Age, Gender, and Stress. *Physiology & Behavior* 1997; 62: 623-630.

Rushen J, Ladewig J. Stress induced hypoalgesia and opioid inhibition of pigs responses to restraint. *Physiology & Behavior* 1991; 50: 1093-1096.

Sann H. Nozizeption und Schmerz. In: *Physiologie der Haustiere*. 2010. ed: Von Engelhardt W, Breves G. Enke Verlag, Stuttgart. 75-79.

Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? *Nature Neuroscience* 2002; 5: 1062-1067.

Schönreiter S, Huber H, Lohmüller V, Zanella AJ, Unshelm J, Henke J, Erhardt W. Salivary cortisol as a stress parameter in piglets. *Tierärztliche Praxis Ausgabe Großtiere/Nutztiere* 1999; 27: 175-179.

Schoss P, Alt M. Are nasal swabs for swine appropriate for the diagnosis of bacterial pneumonia agents? *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 1995; 102: 427-430.

Schulz C, Ritzmann M, Palzer A, Otten W, Heinritzi K. Verlauf der Noradrenalin- und Adrenalin-konzentrationen vor und nach der Kastration von Saugferkeln mit und ohne Isofluran-Narkose. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 2007; 114: 454-459.

Schulz C. Auswirkung einer Isofluran-Inhalationsnarkose auf den Kastrationsstress und die postoperativen Kastrationsschmerzen von Ferkeln. Diss. med. vet. 2007. Ludwig-Maximilians-Universität, München

Sgoifo A, De Boer SF, Haller J, Koolhaas JM. Individual Differences in Plasma Catecholamine and Corticosterone Stress Responses of Wild-Type Rats: Relationship With Aggression. *Physiology & Behavior* 1996; 60: 1403-1407.

Silbernagel S, Despopoulus A. Zentralnervensystem und Sinne. In: *Taschenatlas Physiologie*. 2012a. ed: Silbernagel S, Despopoulus A. Thieme, Stuttgart. 328-394.

Silbernagel S, Despopoulus A. Atmung. In: *Taschenatlas Physiologie*. 2012b. ed: Silbernagel S, Despopoulus A. Thieme, Stuttgart. 112-144.

Silbernagel S, Despopoulus A. Vegetatives Nervensystem. In: *Taschenatlas Physiologie*. 2012c. ed: Silbernagel S, Despopoulus A. Thieme, Stuttgart. 82-92.

Silbernagel S, Despopoulus A. Hormone, Reproduktion. In: Taschenatlas Physiologie. 2012d. ed: Silbernagel S, Despopoulus A. Thieme, Stuttgart. 280-328.

Skarlandtova H, Bicikova M, Neuzil P, Mlcek M, Hrachovina V, Svoboda T, Medova E, Kudlicka J, Dohnalova A, Havranek S, Kazihnitkova H, Macova L, Kittnar O. Is there circadian variation in cortisol levels in young sows in heart catheterization? Prague medical report 2011; 112: 184-192.

Smith SM, Vale WW. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. Dialogues in Clinical Neuroscience 2006; 8: 383-395.

Sörös P, Knecht S, Bantel C, Imai T, Wüsten R, Pantev C, Lütkenhöner B, Bürkle H, Henningsen H. Functional reorganization of the human primary somatosensory cortex after acute pain demonstrated by magnetoencephalography. Neuroscience Letters 2001; 298: 195-198.

Starke K. Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems. In: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 2013. ed: Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K. Urban&Fischer, München. 105-135.

Sylvester SP, Stafford KJ, Mellor DJ, Bruce RA, Ward RN. Acute cortisol responses of calves to four methods of dehorning by amputation. Australian Veterinary Journal 1998; 76: 123-126.

TäBeO (2011) Berufsordnung für die Tierärzte in Bayern. Bayerische Landestierärztekammer, DTBl 1986, (zuletzt geändert am 01. Januar 2011 (DTBl. 1/2011, S. 88 f.)). 867 ff.

TierSchG (2013) Tierschutzgesetz, "Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 4 Absatz 90 des Gesetzes vom 7. August 2013 (BGBl. I S. 3154) geändert worden ist" edn. Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz, BGBl

Treede R-D. Das somatosensorische System. In: Physiologie des Menschen. 2007. ed: Schmidt RF, Lang F. Springer, Heidelberg. 296-323.

Übel N. Untersuchungen zur Schmerzreduktion bei zootechnischen Eingriffen an Saugferkeln. Diss. med. vet. 2011. Ludwig-Maximilians-Universität, München

Van Alstine WG. Respiratory Diseases. In: Diseases of Swine, 10th edn. 2012. ed: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW. Wiley-Blackwell, Chichester. 348-363.

Van Reeth K, Brown IH, Olsen CW. Influenza Virus. In: Diseases of swine, 10 edn. 2012. ed: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GJ. Wiley-Blackwell, Chichester. 557-572.

Veissier I, Boissy A. Stress and welfare: Two complementary concepts that are intrinsically related to the animal's point of view. Physiology & Behavior 2007; 92: 429-433.

Vining RF, McGinley RA, Symons RG. Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. Clinical Chemistry 1983; 29: 1752-1756.

Viñuela-Fernández I, Jones E, Welsh EM, Fleetwood-Walker SM. Pain mechanisms and their implication for the management of pain in farm and companion animals. The Veterinary Journal 2007; 174: 227-239.

Von Borell E. Schmerzen bei Schweinen - Beurteilung, Vermeidung und Verminderung. Tierärztliche Umschau 2013; 68: 227-230.

Ward MM, Mefford IN, Parker SD, Chesney MA, Taylor CB, Keegan DL, Barchas JD. Epinephrine and norepinephrine responses in continuously collected human-plasma to a series of stressors. Psychosomatic Medicine 1983; 45: 471-486.

Widdicombe J. Neurophysiology of the cough reflex. *European Respiratory Journal* 1995; 8: 1193-1202.

Wilmore DW, Long JM, Mason AD, Pruitt BA. Stress in surgical patients as a neurophysiologic reflex response. *Surgery Gynecology & Obstetrics* 1976; 142: 257-269.

Zimmermann S. Untersuchungen zur Wirkung der Betäubung mittels Kohlendioxid bei der Kastration männlicher Saugferkel. Diss. med. vet. 2010. Ludwig-Maximilians-Universität, München

Zimmermann S, Zöls S, Otten W, Palzer A, Ritzmann M, Heinritzi K. Evaluation of carbon dioxide anaesthesia for the castration of male suckling piglets by stress hormone concentrations, behaviour and clinical factors. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 2011; 124: 368-375.

Zöls S, Ritzmann M, Heinritzi K. Einfluss von Schmerzmitteln bei der Kastration männlicher Ferkel. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 2006; 119: 193-196.

Zöls S. Möglichkeiten der Schmerzreduzierung bei der Kastration männlicher Saugferkel. Diss. med. vet. 2006. Ludwig-Maximilians-Universität, München

## **X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

<i>Abbildung 1: Zeitplan der Cortisoluntersuchungen .....</i>	<i>33</i>
<i>Abbildung 2: Zeitplan der Katecholaminuntersuchungen .....</i>	<i>35</i>
<i>Abbildung 3: Durchführung eines Tracheobronchialabstriches .....</i>	<i>37</i>
<i>Abbildung 4: Verlauf der mittleren Cortisolkonzentrationen (nmol/l) im Serum der vier Gruppen über die Zeit t (min) .....</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 5: Verlauf der mittleren Cortisolkonzentrationen im Serum der Gruppen OK und KO (AUC).....</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 6: Verlauf der mittleren Cortisolkonzentrationen (nmol/l) im Speichel aller vier Gruppen über die Zeit t (min).....</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 7: Mittlere NoradrenalinKonzentrationen (pg/ml Plasma) der vier Gruppen vor (prae) und nach (post) dem Eingriff.....</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 8: Mittlere AdrenalinKonzentrationen (in pg/ml Plasma) der vier Gruppen vor (prae) und nach (post) dem Eingriff.....</i>	<i>51</i>

## **XI. TABELLENVERZEICHNIS**

<i>Tabelle 1: Zusammenfassung der wichtigsten Wirkungen von Cortisol nach MÖSTL (2010) und SILBERNAGEL und DESPOPOULUS (2012d).....</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 2: Gruppeneinteilung Cortisol- und Katecholaminuntersuchungen .....</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 3: Mittlere Cortisolkonzentrationen im Serum in nmol/l vor sowie 30 min, 60 min und 90 min nach dem Studieneingriff, mit Minima, Maxima, Standardabweichungen (SD), Standardfehler (SEM) und der area-under-the-curve (AUC) der vier Gruppen.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 4: p-Werte der Vergleiche der mittleren Cortisolkonzentrationen oder AUC (Serum) der Gruppen TBA, OK, NT und KO zu den vier Beprobungszeitpunkten.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 5: p-Werte der Vergleiche der mittleren Cortisolkonzentrationen (Serum) verschiedener Beprobungszeitpunkte innerhalb einer Gruppe .....</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 6: Mittlere Cortisolkonzentrationen im Speichel in nmol/l vor sowie 30 min, 60 min und 90 min nach dem Studieneingriff, mit Minima, Maxima, Standardabweichungen (SD), Standardfehler (SEM) und der area-under-the-curve (AUC) der vier Gruppen.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 7: p-Werte der Vergleiche der mittleren Cortisolkonzentrationen oder AUC (Speichel) der Gruppen TBA, OK, NT und KO zu den vier Beprobungszeitpunkten.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 8: p-Werte der Vergleiche der mittleren Cortisolkonzentrationen (Speichel) verschiedener Beprobungszeitpunkte innerhalb einer Gruppe .....</i>	<i>46</i>
<i>Tabelle 9: Mittlere NoradrenalinKonzentrationen, Standardabweichungen (SD), Minima, Maxima und Standardfehler (SEM) der vier Gruppen in pg/ml Plasma vor (prae) und nach (post) dem Eingriff.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 10: p-Werte der Vergleiche der mittleren NoradrenalinKonzentrationen der Gruppen TBA, OK, NT und KO zu den zwei Beprobungszeitpunkten.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 11: p-Werte der Vergleiche der mittleren NoradrenalinKonzentrationen innerhalb einer Gruppe im Vergleich prae / post Eingriff.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 12: Mittlere AdrenalinKonzentrationen, Standardabweichungen (SD), Minima, Maxima und Standardfehler (SEM) der vier Gruppen (pg/ml Plasma) vor (prae) und nach (post) dem Eingriff.....</i>	<i>50</i>

---

<i>Tabelle 13: p-Werte der Vergleiche der mittleren Adrenalinkonzentrationen zwischen den Gruppen TBA, OK, NT und KO zu den zwei Beprobungszeitpunkten .....</i>	<i>52</i>
<i>Tabelle 14: p-Werte der Vergleiche der mittleren Adrenalinkonzentrationen innerhalb einer Gruppe im Vergleich prae / post Eingriff.....</i>	<i>52</i>

## **XII. DANKSAGUNG**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Mathias Ritzmann für die Bereitstellung dieses interessanten Themas. Sie waren jederzeit ein ausgezeichnete Doktorvater und ein hervorragender Chef in der Klinik für Schweine.

Ich freue mich auf zwei wunderbare und lehrreiche Jahre an der Klinik für Schweine zurückschauen zu dürfen. Ein ganz besonderes Dankeschön richte ich an meine beiden Betreuerinnen Dr. Nicole Übel und Dr. Susanne Zöls, die mich stets unterstützt haben und jederzeit Rat wussten. Vielen Dank für eure guten Anregungen, unermüdlichen Korrekturen und die Lösung sämtlicher Computerprobleme. Liebe Dr. Jasmin Stark und Dr. Regina Hausleitner Dankeschön für das gemeinsame Zähmen des Elecsys und vielen Dank an Dr. Julia Stadler und Dr. Matthias Eddicks für die Beantwortung aller fachlichen Fragen und euren umfassenden Rat.

Den besten Mitdoktoranden, auch den bereits Ausgeschiedenen, möchte ich besonders danken. Ohne euch und die Rotationsstudenten, denen ich an dieser Stelle ebenfalls herzlich danke, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Wir Doktoranden waren eine super Truppe. Es hat wahnsinnig viel Spaß gemacht mit euch so viele lehrreiche und lustige Tage und Ausfahrten zu verbringen sowie in unangenehmeren Situationen Aufbau und Halt zu spüren. Außerdem konnte ich mein Schweinemast- und Grillwissen erweitern!

Ich danke vielmals auch Konrad und allen anderen Mitarbeitern des Versuchsgutes Thalhausen für die unkomplizierte und hilfsbereite Zusammenarbeit sowie Frau Dr. Sauter-Louis und Herrn Dr. Reese für die wertvolle statistische Beratung.

Gedankt sei auch Frau Dr. Pausenberger für ihre Impulse zur Durchführung und ihre wertvollen Anregungen vor allem zu Beginn dieser Arbeit.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Otten und seinem Laborteam vom FBN Dummerstorf für die hilfreiche Beratung, die gute Zusammenarbeit und das Auswerten der Katecholaminproben.

Dr. Matthias Huber und der gesamten Praxis danke ich für die Unterstützung und das große Verständnis von zum Teil recht kurzfristigen Planänderungen.

Bedanken möchte ich mich auch für die ideelle und finanzielle Unterstützung durch die Promotionsförderung des Cusanuswerkes, die entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen und mich persönlich weitergebracht hat.

Meinen Freunden aus München und daheim, die mich zum Teil auch aus Hamburg unterstützen, meinen Mitbewohnern der alten und neuen WG sowie meinen Studienfreundinnen, Lisa mit dir hatte ich das Glück auch noch die Promotion gemeinsam zu bestreiten, danke ich ganz besonders. Vielen Dank für eure Freundschaft, ihr seid immer für mich da, hört zu und habt mich stets er- und aufgemuntert!

Meiner Familie, die mir diesen Weg ermöglicht und mich in jeder Hinsicht gefördert hat (angefangen bei Care Paketen im Studium) danke ich von Herzen. Danke für eure bedingungslose Unterstützung und, dass ihr mir immer die Sicherheit vermittelt, dass ich mich auf euch verlassen kann!