Einfluss einer ultrasonographischen Untersuchung als Stressreiz auf die Substanz P und Cortisolkonzentrationen und das Verhalten bei Kälbern

von Hannah Kerber

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

Einfluss einer ultrasonographischen Untersuchung als Stressreiz auf die Substanz P und Cortisolkonzentrationen und das Verhalten bei Kälbern

von Hannah Kerber

aus Hall in Tirol

München 2026

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin und Chirurgie der Wiederkäuer

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

Mitbetreuung durch: Dr. Theresa Tschoner-Utza

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.
Berichterstatterin:	Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer
Korreferentin:	Priv.-Doz. Dr. Elke Rauch

Tag der Promotion: 07. Februar 2026

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG 1

II. LITERATURÜBERSICHT 3

1. Stress 3

1.1. Definition 3

1.2. Physiologie des Stresses 4

2. Stress und Nozizeption 6

2.1. Messung von Stress und Nozizeption 6

2.1.1. Subjektive Methoden 6

2.1.1.1. Ethogramm 7

2.1.1.2. Facial Grimace Scale 8

2.1.1.3. Numerische Rating-Skala und visuelle Analogskala 9

2.1.2. Objektive Methoden 11

2.1.2.1. Aktivität 11

2.1.2.2. Tränkeaufnahme bzw. Futteraufnahme 12

2.1.2.3. Cortisol 13

2.1.2.4. Substanz P 14

2.1.2.5. Glukose 14

2.2. Unterschied zwischen Stress und Nozizeption 15

3. Substanz P und Stress 16

3.1. Definition und Historie von Substanz P 16

3.2. Bisherige Forschungsarbeit zu Substanz P 17

3.3. Forschung zu Substanz P in Verbindung mit Stress 18

3.3.1. Forschung zu Substanz P und Stress in der Humanmedizin 18

3.3.2. Forschung zu Substanz P und Stress bei Labortieren 19

3.3.3. Forschung zu Substanz P und Stress bei Pferden 20

3.3.4. Forschung zu Substanz P und Stress bei Hund und Katze 21

3.3.5. Forschung zu Substanz P und Stress in der Rindermedizin 21

III. PUBLIKATION 23

IV. DISKUSSION 53

1.1. Versuchstiere 53

1.2. Stressreiz 54

1.3. Plasma-Substanz P-Konzentrationen 55
1.4. Korrelation zwischen Plasma-Substanz P-Konzentrationen und Plasma-Cortisolkonzentrationen 57
1.5. Speichel-Substanz P-Konzentrationen 57
1.6. Plasma-Cortisolkonzentrationen 59
1.7. Glukosekonzentrationen im Blut.....60
1.8. Verhalten am Tag des Versuchs.....61
1.9. Verhaltensbeurteilung während des Stressreizes 62
1.10. Aktivität und Anzahl der Schritte.....64
1.11. Milchaufnahme.....65

V. FAZIT.....67

VI. ZUSAMMENFASSUNG 68

VII. SUMMARY.....70

VIII. LITERATURVERZEICHNIS 72

IX. DANKSAGUNG.....109

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAS	Allgemeines Anpassungssyndrom
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AF	Atemfrequenz
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
h	Stunde
HF	Herzfrequenz
HHNA-Achse, im englischen HPA-axis	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse, im englischen hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis
HNA-Achse, im englischen SAM-axis	Hypothalamus-Nebennierenmark-Achse, im englischen sympathic adrenomedullary axis
min	Minute
MNT	Mechanische Schmerzschwelle
NRS	Numerische Rating-Scala, im englischen numeric rating scala
PCC	Plasma cortisol concentration, Plasma-Cortisolkonzentration
PSPC	Plasma substance P concentration, Plasma-Substanz P-Konzentration
PTBS	Posttraumatische Belastungsstörung
SIA	Stressinduzierte Analgesie
SIH	Stressinduzierte Hyperalgesie
SP	Substanz P
SSPC	Saliva substance P concentration, Speichel-Substanz P-Konzentration
VAS	Visuelle Analogskala, im englischen visual analogue scala
ZNS	Zentrales Nervensystem

I. EINLEITUNG

„Tiere reden mit den Augen oft vernünftiger als Menschen mit dem Mund.“ (Ludovic Halévy, französischer Dramatiker). Im Gegensatz zu menschlichen Patient*innen fehlt den tierischen die Fähigkeit der Verbalisierung. Damit einher geht das Unvermögen die Unwahrheit zu sprechen.

So stützt sich die Schmerzerkennung bei Nutztieren hauptsächlich auf eine Kombination von verhaltenstechnischen und physiologischen Reaktionen, obwohl diese sehr subjektiv und schwierig zu quantifizieren sind (GHODASARA et al., 2022). Das stoische Wesen von Rindern und die Fähigkeit, Schmerz und Unbehagen in hohem Maße zu maskieren, macht eine Bewertung umso schwieriger (HUDSON et al., 2008).

Die subjektive Schmerzerkennung stützt sich auf das Ethogramm, die visuelle Analogskala (VAS), die numerische Rating-Skala (NRS) und die Beurteilung des Gesichtsausdrucks. Das Erheben von Parametern wie mechanische Schmerzschwelle (MNT), Aktivität, Schritt-Monitoring mittels Pedometer, Augentemperatur-Messung, Herzfrequenz, Futteraufnahme, durchschnittliche tägliche Gewichtszunahme, Konzentrationen von Substanz P (SP) und allen voran Cortisol, gelten als objektive Mittel zur Schmerzerkennung (TSCHONER, 2021).

Der Cortisolspiegel steigt jedoch sowohl bei schmerzbedingtem als auch bei klassischem Stress (umweltbedingt, haltungsbedingt, transportbedingt etc.) an. Simultane Messungen der Plasmakonzentrationen von SP und Cortisol könnten sich zur Differenzierung als nützlich erweisen (COETZEE et al., 2008). Es wird angenommen, dass SP eine höhere Objektivität als Biomarker zur Erkennung von Nozizeption aufweist, als Cortisol (WHITLOCK et al., 2012).

SP ist ein sensorischer Neurotransmitter aus der Familie der Tachykinine und besteht aus 11 Aminosäuren (CHANG et al., 1971). SP reguliert die Erregbarkeit der nozizeptiven Neuronen des Dorsalhorns und kann in bestimmten Bereichen der Neuroachse gefunden werden. Diese Bereiche sind wiederum bei der Integration von Angst, Stress und Schmerz involviert (DEVANE, 2001). Studien aus der Humanmedizin konnten SP außerdem sowohl entzündungsfördernde Effekte (O'CONNOR et al., 2004), als auch eine Beteiligung bei Depressionen (BONDY et al., 2003; GERACIOTI et al., 2006) und stressbedingten Aborten (JOACHIM et al.,

2001; TOMETTEN et al., 2004) nachweisen. Daten aus Tierversuchen, welche verminderte SP-Konzentrationen in mehreren Gehirnarealen als Folge von Therapien mit verschiedenen Antidepressiva belegen (SHIRAYAMA et al., 1996), stützen diese Feststellung zusätzlich.

Seit 2008 wurden mehrere Studien zum Verlauf von SP-Konzentrationen bei adulten Rindern und Kälbern während verschiedener (schmerzhafter) Eingriffe veröffentlicht. Studienplanung, Gruppeneinteilung, Alter und Gewicht der Tiere, Verarbeitung der Blutproben zur Beurteilung von SP, und die Ergebnisse waren jedoch uneinheitlich (TSCHONER & FEIST, 2022). An dieser Stelle fehlt es an grundlegender, vergleichbarer Forschung, um die Rolle von möglichen Einflussfaktoren auf SP-Konzentrationen beim Rind näher definieren zu können.

Diese Dissertation ist Bestandteil eines dreiteiligen Forschungsprojekts, welches sich mit dem Einfluss der Faktoren Stress, Schmerz und Entzündung auf SP-Konzentrationen beim Rind beschäftigt. Die vorliegende Arbeit hat den Faktor Stress zum Gegenstand. Hierbei wurden 4 bis 6 Wochen alte, männliche Fleckviehkälber einem Stressreiz (in Form eines Herzultraschalls in einem Zwangsstand) ausgesetzt und Konzentrationen von sowohl SP als auch Cortisol, und Glukose, und verschiedene andere (Verhaltens-)Parameter simultan gemessen.

Ziel des Forschungsprojekts ist es zu untersuchen, durch welche Reize (Stress, Schmerz, Entzündung) sich die SP-Konzentrationen beim Rind verändern, womit die Rolle von SP als Biomarker für Nozizeption bestätigt werden könnte.

Die Ziele der vorliegenden Studie waren daher

1) die SP-Konzentration im Blutplasma gesunder Kälber der Rasse Deutsches Fleckvieh, die einem Stressreiz ausgesetzt sind, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu bewerten.

2) festzustellen, ob es eine Korrelation zwischen den SP-Konzentrationen in Blut- und Speichelproben gibt.

3) eine mögliche Korrelation von SP-Konzentrationen und Cortisolkonzentrationen im Blutplasma und Verhaltensänderungen während und nach dem Versuchszeitraum zu beschreiben.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Stress

1.1. Definition

Es existieren zahlreiche verschiedene Definitionen von Stress. Für viele als Vater der Stressforschung geltend, war es Hans Selye, der den Begriff Stress erstmals in das medizinische Lexikon aufnehmen ließ und ihn als eine nicht spezifische Antwort des Körpers auf jegliche Anforderung beschrieb (TAN & YIP, 2018). So wurde eine Stressreaktion in drei nacheinander ablaufende Phasen eingeteilt: Gefahr, Widerstand und Erschöpfung (AAS = Allgemeines Anpassungssyndrom bzw. im englischen als GAS, general adaption syndrome, bekannt) (SELYE, 1936). Nachdem weitere Forschung hinsichtlich des Stress-Konzepts betrieben wurde, hielt Selye eine Unterteilung des Stressbegriffs in „Eustress“, „Distress“, „systemischen Stress“ und „lokalen Stress“ für notwendig (SELYE, 1975).

Diese Begriffe werden wie folgt definiert (LU et al., 2021):

> Eustress: Repräsentiert guten Stress. Es ist ein Zustand der Homöostase, der durch mäßige Stressfaktoren, z. B. innerhalb der hermetischen Zone, leicht beeinträchtigt wird. Diese Stressfaktoren können wiederum eine leichte Stressreaktion auslösen, welche die Pufferkapazität der Homöostase verbessert und die Gesundheit fördert.
>
> Distress: Repräsentiert schlechten Stress. Es ist ein Zustand der Homöostase, der durch starke Stressfaktoren erheblich beeinträchtigt wird. Diese Stressfaktoren können wiederum eine schwerwiegende Stressreaktion auslösen, welche die Homöostase verschlechtert, und die Gesundheit gefährdet.
>
> Systemischer Stress: Systematisch im gesamten Körper auftretender Stress, unabhängig vom Ursprung der Stressoren. Beispielsweise emotionale Veränderungen, die die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHNA-Achse, im englischen HPA = hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis) auslösen, werden als

emotionaler Stress bezeichnet.

Lokaler Stress: Nur am Ort des Stressoren-Ursprungs auftretender Stress. Stress, der durch die Anhäufung von ungefalteten Proteinen im endoplasmatischen Retikulum ausgelöst wird, wird beispielsweise als endoplasmatischer Retikulumstress bezeichnet.

Obwohl die Arbeit Selyes zweifelsfrei als Pionierleistung in der Stressforschung anzuerkennen ist, sind gewisse Schwächen seiner Theorie nicht von der Hand zu weisen (KROHNE, 2017). Vor allem das Konzept der unspezifischen Auslösung des AAS (MASON, 1975b; 1975c, 1975a) und der fehlende Einbindung von psychologischen Faktoren, wie Erwartungen, Bewertungen und Bewältigungsmaßnahmen bei Stressreaktionen, wurden bemängelt (LAZARUS & LAUNIER, 1978).

Ein aktuelles Stresskonzept ist das der Allostase, welche als eine Erweiterung der Theorie der Hämostase betrachtet wird (MCEWEN & SEEMAN, 2002). Der Ausdruck „Allostase“ beschreibt die Fähigkeit von Organismen, sich durch grundlegende Prozessänderungen aktiv an voraussehbare und unvorhersehbare Ereignisse anzupassen. Diese Anpassungsreaktion ist vorerst adaptiv, kann bei sogenannter “allostatischer Überbelastung“ (z. B. extreme körperliche Anforderungen) jedoch ernsthafte pathophysiologische Probleme verursachen (MCEWEN & WINGFIELD, 2003).

FRASER et al. (1975) diskutierten schließlich verschiedene Definitionen und Stresskonzepte bezogen auf die Veterinärmedizin. Laut ihnen befindet sich ein Tier im Stresszustand, wenn es gezwungen ist, abnormale oder extreme Anpassungen in seiner Physiologie oder seinem Verhalten vornehmen zu müssen, um ungünstige Aspekte seiner Umgebung oder seines Managements bewältigen zu können.

Weder Stress noch Schmerz kann von Tieren verbalisiert werden, weswegen hier auf Beurteilung verschiedene Parameter wie dem Verhalten oder Biomarkern im Blut zurückgegriffen werden muss.

1.2. Physiologie des Stresses

Im Laufe der Zeit wurde zunehmend deutlich, dass Tiere, genauso wie Menschen, Stress empfinden und auch ähnliche Krankheiten entwickeln (MOBERG, 2000).

Der heutige Wissensstand über die zentralnervöse Verarbeitung von Stressoren und damit der zentralnervösen Mechanismen der Stressreaktion stammt dabei zum Großteil aus Tierstudien. Im Humanbereich sind dagegen noch viele Fragen ungeklärt (PRUESSNER et al., 2010).

In der Stressforschung werden vor allem zwei Teilsysteme oder Achsen untersucht, die in belastenden Situationen die Reaktionen des Organismus hormonell regulieren: die Hypothalamus-Nebennierenmark-Achse (HNA-Achse, im englischen SAM = sympathic-adrenomedullary axis) und die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHNA-Achse, im englischen HPA = hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis) (NETTER, 2005; GUNNAR & QUEVEDO, 2006). Das optimale Funktionieren der SAM- und HPA-Systeme wird durch komplementäre Co-Aktivierung erreicht (BAUER et al., 2002; WADSWORTH et al., 2019).

Weitere wichtige Strukturen der Stressreaktion sind die Amygdala, der Hippocampus, sowie der präfrontale Kortex. Diese sind Teilstrukturen des sogenannten limbischen Systems, das unter anderem für die Emotionsverarbeitung entscheidend ist. Der präfrontale Kortex kann sowohl aktivierende als auch hemmende Wirkungen ausüben, während die Amygdala die oben genannten Achsen aktiviert (VON DAWANS & HEINRICHS, 2018).

In der HNA-Achse bewirkt eine zentralnervöse Aktivierung des Sympathikus eine direkte Übertragung der Erregung auf die Organe und eine Ausschüttung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin durch die Aktivierung des Nebennierenmarks. Dass eine gesteigerte Belastung des Körpers mit gesteigerter Aktivität des Nebennierenmarks einhergeht, hatte bereits CANNON (1915) festgestellt. Die Katecholamine haben wiederum eine aktivierende Wirkung auf die Atmung, die Herzleistung, sowie den Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel (Notfallfunktion), wodurch der Organismus verstärkte Kampf- oder Fluchtreaktionen („fight-or-flight-reactions“) entwickelt (KROHNE, 2017).

Betrachtet man die HHNA-Achse, spielt vor allem die Ausschüttung von Cortisol eine große Rolle. Hier führt das Stresssignal zunächst zu einer Freisetzung von Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) aus dem Hypothalamus, welches wiederum die Hypophyse zur Ausschüttung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) anregt. ACTH gelangt schließlich durch die Blutbahn zur Nebenniere und

veranlasst das Nebennierenmark zur Freisetzung von Cortisol (BALE & VALE, 2004; VON DAWANS & HEINRICHS, 2018).

2. Stress und Nozizeption

2.1. Messung von Stress und Nozizeption

Die genaue Bewertung von Stress und Schmerz ist ein wichtiger Teil der Gewährleistung eines guten Wohlbefindens von Rindern (WINDER et al., 2018). Eine alleinige Messung von Stress und Schmerz gestaltet sich jedoch oft schwierig, da Nozizeption neben Schmerz auch zu Stress führt (COETZEE et al., 2008). Zudem sind die Parameter zur Messung von Stress und Schmerz fast ident und können sich gegenseitig beeinflussen. Verminderte Aktivität, gesenkte Kopfhaltung, Zähneknirschen und eine erhöhte Atemfrequenz gelten beispielsweise sowohl als Schmerz- als auch als Stressindikator PEINHOFER (2013).

Stress und negative affektive Zustände, wie Angst oder Depression haben einen komplexen Einfluss auf Schmerzen, die entweder adaptiv und überlebenswichtig (stressinduzierte Analgesie, SIA) oder maladaptiv (stressinduzierte Hyperalgesie, SIH) sein können (IMBE et al., 2006; FORD & FINN, 2008; ASMUNDSON & KATZ, 2009; BUTLER & FINN, 2009; WIECH & TRACEY, 2009; JENNINGS et al., 2014; OLANGO & FINN, 2014). Zudem können akute, sowie chronische Schmerzzustände zu Stress und Angststörungen führen (EGLOFF et al., 2021).

Um Stress bzw. generelles Unbehagen bei einem Tier genau zu beurteilen, ist laut GRANDIN (1997) eine Kombination aus Verhaltens- und physiologischen Messungen am besten geeignet. Ähnlich verhält es sich bei der Schmerzmessung, bei welcher, aufgrund der multifokalen Einflüsse, eine Kombination aus subjektiven und objektiven Parametern empfohlen wird, um zuverlässige und umfassende Ergebnisse zu erhalten (WEARY et al., 2006; HUDSON et al., 2008).

Im Folgenden werden die Parameter zur Schmerzmessung erklärt, wobei auch der jeweilige Einfluss von Stress berücksichtigt und diskutiert wird.

2.1.1. Subjektive Methoden

Subjektive Schmerzerkennung hängt stark von der Erfahrung und Einschätzung der

untersuchenden Person ab, weswegen gut ausgebildete und erfahrene Untersucher*innen unerlässlich für eine gute Beurteilung sind (HUDSON et al., 2008). Die erfassten Verhaltensweisen sollten klar definiert sein. Aufgrund von hoher Verhaltensvariabilität sind Ergebnisse nur bei einer großen Anzahl von Versuchstieren aussagekräftig (FRASER & BROOM, 1990; HUDSON et al., 2008). Außerdem deutet das normale Verhalten eines Tieres nicht immer auf einen schmerz- und/oder stressfreien Zustand hin, da das Maskieren von Schmerz in der Wildnis auch dazu dient, Raubtieren zu entgehen (BOMZON, 2011).

2.1.1.1. Ethogramm

Laut PRUNIER et al. (2013) können bei einer Schmerzreaktion 5 Verhaltensindikatoren unterschieden werden, wobei die ersten 4 darauf abzielen, den schmerzhaften Reiz abzuschwächen bzw. zu vermeiden. Dazu zählen: 1) Vermeidungs- und Abwehrverhalten, 2) Lautäußerungen, 3) Verhaltensweisen, die sich gegen den schmerzhaften Bereich richten, 4) Körperhaltungen und Verhaltensweisen, die dazu dienen, die Stimulation des schmerzhaften Bereichs zu reduzieren. Die fünfte Kategorie, allgemeine Veränderungen in der Aktivität der Tiere, bezieht sich auf Veränderungen der Aktivität, Bewegungslosigkeit oder Unruhe, Fressen, Trinken, Sozialverhalten und Körperpflege.

In Bezug auf Stress hat sich die Forschung auf zwei Reaktionsmuster konzentriert (JURKOVICH et al., 2024). Die aktive Reaktion, die ursprünglich von CANNON (1935) als „Kampf oder Flucht“-Reaktion beschrieben wurde und durch Territorialkontrolle und Aggression gekennzeichnet ist (HENRY & STEPHENS, 1977) und die Erhaltungs-Rückzugs-Reaktion (ENGEL & SCHMALE, 1972), die durch passive Reaktionen wie Immobilität, Urinieren, Kotabsatz und ein geringes Maß an Aggression gekennzeichnet ist (VAN REENEN et al., 2005; FORKMAN et al., 2007).

Da sich Stress, Schmerz und Angst gegenseitig beeinflussen (HENKE & ERHARDT, 2001), ist es schwierig Schmerz und Stress isoliert voneinander zu beurteilen. Einschränkungen der Verhaltensbeobachtung bestehen mitunter durch die Schwierigkeit, schnell auftretende Verhaltensweisen (z. B. Ohrenbewegungen) zum Zeitpunkt des Geschehens korrekt zu erfassen (ALTMANN, 1974). Studien haben außerdem gezeigt, dass die Präsenz eines beobachtenden Menschen das Verhalten von Rindern beeinflusst (GRIGNARD et al., 2000; ISHIWATA et al.,

2006). Aufgrund dieser Einschränkungen erfolgt die Überwachung dieser Verhaltensweisen in der Regel durch Videoanalysen (THEURER et al., 2013).

2.1.1.2. Facial Grimace Scale

Das stoische Wesen von Rindern und die Fähigkeit, Schmerz und Unbehagen in hohem Maße zu maskieren, gestaltet die Messung derselben umso schwieriger (HUDSON et al., 2008). Forschung an anderen, vermeintlich stoischen Tierarten, wie Pferden (DALLA COSTA et al., 2014; GLEERUP et al., 2015b), Ratten (SOTOCINAL et al., 2011), Mäusen (LANGFORD et al., 2010) und Kaninchen (KEATING et al., 2012), wiesen eine gute Voraussagbarkeit von Schmerz bei subtilen Verhaltensänderungen auf, wozu laut LEACH et al. (2012) auch der Gesichtsausdruck zählt. Nach der Entwicklung des „Equine Pain Face“ (GLEERUP et al., 2015b) wurde erstmals auch an einer Schmerzskala für Rinder gearbeitet, die das „Bovine Pain Face“ inkludierte (GLEERUP et al., 2015a). Die Gesichtsskalen beider Tierarten beruhen auf Veränderung der Ohren, der Augen, der Gesichtsmuskulatur und des (Flotz)mauls (GLEERUP et al., 2015a; GLEERUP et al., 2015b). Das Schmerzgesicht bei Rindern nach GLEERUP et al. (2015a) charakterisiert sich durch:

1) Angespannte und nach hinten gerichtete, oder hängende, lammähnliche Ohren.
2) Ausdruckslose Augen, angespannter Blick und mit halb geschlossenen oder hängenden Augenlidern. Die Anspannung der Augenmuskulatur kann sich durch „Furchenlinien“ über dem Auge zeigen.
3) Verspannungen der Gesichtsmuskulatur an der Seite des Kopfes
4) Geweitete, angespannte Nasenlöcher, über denen ebenfalls „Falten“ zu sehen sein können.

Die Anwendung der Grimace Scale zur isolierten Messung von Schmerz hat allerdings ihre Grenzen, da auch die Anwesenheit eines/einer Beobachter*in und die Umgebung des Tieres die Aufmerksamkeit und den Gesichtsausdruck beeinflussen, und verschiedene Ausdrücke dabei auch schmerzunabhängig auftreten können (JOHNSTON et al., 2022). Die Anwesenheit einer beobachtenden Person (KARLEN et al., 2019), sowie die Umgebung in der sich das Tier befindet (unter anderem verschiedene äußere Umstände und Managementtechniken (OGINO et al., 2014)), haben eine unmittelbare Steigerungen des Cortisolspiegels

zur Folge und können somit als Stressreiz betrachtet werden. In einer Studie verbrachten Lämmer, die ein verwandtes Lamm mit Schmerzen beobachteten, mehr Zeit mit nach hinten gerichteten Ohren (GUESGEN, 2015) als Kontrolltiere, was auch als ein Indikator für einen negativen emotionalen Zustand im Zusammenhang mit Schmerzen angesehen wurde (GUESGEN et al., 2016). Diese Beispiele zeigen, dass auch Stress durch negative Emotionen einen Einfluss auf den Gesichtsausdruck haben können.

2.1.1.3. Numerische Rating-Skala und visuelle Analogskala

Sowohl numerische Rating-Skala (NRS) als auch die visuelle Analogskala (VAS), stammen ursprünglich aus der Humanmedizin und sind unidimensionale single-item-Skalen, welche eine Einschätzung zur Schmerzintensität eines/einer Patienten/Patientin liefern (HAWKER et al., 2011).

Die numerische Rating-Skala (NRS) wird üblicherweise verwendet um die Schmerzintensität zu einem bestimmten Zeitpunkt anhand einer Skala von 0 bis 10 zu bewerten, wobei 0 „keine Schmerzen“ und 10 „die am schlimmsten vorstellbaren Schmerzen“ bedeutet (BREIVIK et al., 2008). In der Humanmedizin wird die NRS in vielen klinischen Bereichen der ambulanten Pflege regelmäßig zur Schmerzerkennung eingesetzt (NUGENT et al., 2021) und kann entweder graphisch oder verbal erfasst werden (WILLIAMSON & HOGGART, 2005). In der Veterinärmedizin findet diese Skala meist in Erhebungen zur Schmerzbeurteilung bei erwachsenen Rindern und Kälbern Verwendung (TSCHONER, 2021). Nachteile sind eine mangelnde Spezifität, da es sich um simple Beschreibungen handelt, die stark gewichtet werden (MATHEWS, 2000) und eine geringe Sensitivität, durch die starke Vereinfachung der Kategorien des Aktivitätsniveaus (GRISNEAUX et al., 1999). Die Bewertung der Schmerzhaftigkeit, die ein Tier empfindet, hängt zudem von der Erfahrung und der Einstellung der untersuchenden Person ab (HUDSON et al., 2008). Beispielsweise stufen praktizierende Tierärztinnen (KIELLAND et al., 2009; LAVEN et al., 2009; REMNANT et al., 2017; TSCHONER et al., 2020b) und Studentinnen (KIELLAND et al., 2009; TSCHONER et al., 2020b) die Schmerzintensität bestimmter Erkrankungen und Eingriffe als höher ein, als ihre männlichen Kollegen. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch ein hohes Level an Empathie zu einer höheren Einstufung der Schmerzintensität führt (NORRING et al., 2014).

Die VAS wird als 10 cm lange Linie dargestellt, die durch verbale Beschreibungen von „keine Schmerzen“ bis hin zu „am schlimmsten vorstellbare Schmerzen“ führt (KIELLAND et al., 2009; KIELLAND et al., 2010). In der Humanmedizin wird der/die Patient*in gebeten, einen Punkt zu markieren, um die Schmerzintensität anzugeben (WILLIAMSON & HOGGART, 2005), während in der Veterinärmedizin der/die Beobachter*in auf diese Weise die Schmerzhaftigkeit eines Tieres beurteilt (MATHEWS, 2000). In der Kleintiermedizin wurde die VAS in vielen Schmerzstudien verwendet, z. B. bei Hunden (TAYLOR & HOULTON, 1984; WATERMAN & KALTHUM, 1992; LASCELLES et al., 1997) und Katzen (SLINGSBY & WATERMAN-PEARSON, 1998). Beim Rind findet die VAS Anwendung bei der Einschätzung der Schmerzhaftigkeit nach verschiedenen Eingriffen wie Kastrationen (OLSON et al., 2016; MELÉNDEZ et al., 2017; MELÉNDEZ et al., 2018) oder Enthornungen (MIRRA et al., 2018). Darüber hinaus wurde die Skala in mehreren Umfragen zum Thema Schmerzeinschätzung bei Kälbern verwendet, bei denen verschiedene Erkrankungen und Eingriffe anhand der VAS bewertet wurden (KIELLAND et al., 2009; KIELLAND et al., 2010; WIKMAN et al., 2013). Die VAS hat sich in Studien zur Schmerzbeurteilung als eine empfindliche, reproduzierbare und praktikable Methode erwiesen (JENSEN et al., 1986). Allerdings muss die untersuchende Person, wie auch bei der NRS, bereits Erfahrung mit der Beurteilung von Schmerz und der Anwendung der VAS haben (MATHEWS, 2000). Insgesamt wird die VAS bei Rindern als informativer angesehen als die NRS (KIELLAND et al., 2009). Ergebnisse einer Übersichtsarbeit von TSCHONER et al. (2024) zeigen jedoch, dass der Vergleich der beiden Skalen schwierig ist. Zudem gibt es sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin Faktoren, welche die Beurteilung akuter Schmerzen beeinflussen können. Bezogen auf die untersuchende Person sind dies beispielsweise der soziale und/oder der berufliche Status, das Alter, das Geschlecht, der Grad der Empathie und der Bildungsstand (HAEFELI & ELFERING, 2006; HUXLEY & WHAY, 2006; LAVEN et al., 2009; NORRING et al., 2014; REMNANT et al., 2017). Beim Tier können Faktoren wie die Tierart, das Alter, die Rasse, das Geschlecht und auch das Vorliegen früherer Pathologien einen Einfluss haben (HUGONNARD et al., 2004).

Eine Stressreaktion des Tieres kann die Beurteilung anhand von Schmerz-Skalen potentiell beeinflussen. Beispielsweise kann sowohl die menschliche Anwesenheit

(etwa in Form der beobachtenden Person) (HEMSWORTH & COLEMAN, 2010), als auch sanfter Körperkontakt (PROBST et al., 2013) zu einer Stressreaktion bei Rindern führen.

2.1.2. Objektive Methoden

Die objektive Bewertung von Schmerzzuständen kann durch die Beurteilung von physiologischen und Produktionsfaktoren erfolgen (WEARY et al., 2006). Zu den physiologischen Parametern gehören Biomarker wie Cortisol (COETZEE et al., 2008; KARLEN et al., 2019) oder SP (COETZEE et al., 2008; COETZEE et al., 2012b), sowie klinische Parameter wie Herzfrequenz und Herzfrequenzvariabilität (BUSTAMANTE et al., 2015; STOCK et al., 2015). Die gleichen Parameter spielen auch bei der Messung von Stress eine wichtige Rolle. Zu den Produktionsfaktoren zählen die Tageszunahmen bei Mastkälbern (KARLEN et al., 2019) und die Tagesmilchleistung (BARRAGAN et al., 2018). Bei Kälbern kommt die Milchaufnahme als Parameter für Stress (SUTHERLAND et al., 2018) und Hitzestress (DADO-SENN et al., 2020) hinzu, wobei sich diese auch bei der Entstehung von Krankheiten (SUTHERLAND et al., 2018; COSTA et al., 2021) und somit auch unter Einfluss von Schmerz ändert. Auch die Aktivität ist ein Parameter, welcher bei Kälbern sowohl zur Messung von schmerzhaften Zuständen (CURRAH et al., 2009; GIGLIUTO et al., 2014), als auch von Stress (Anzahl der gegangener Schritte) (HALEY et al., 2005) eingesetzt wird. Für eine Übersicht der objektiven Methoden zur Schmerzmessung bieten TSCHONER (2021) und FEIST and TSCHONER (2023) eine genaue Übersicht.

2.1.2.1. Aktivität

Die Aktivität, sowie verschiedene Aktivitätsmuster können bei Rindern und Kälbern objektiv durch den Einsatz eines Accelerometers gemessen werden (OLSON et al., 2016). Accelerometer werden waagrecht an einer Gliedmaße befestigt, wobei je nach Gerätetyp verschiedene Sensorausgaben wie Stehen, Liegen, Gehen oder Anzahl an Schritten (PAULY et al., 2012; OLSON et al., 2016) erfasst werden. Mit Blick auf das vergangene Jahrzehnt fanden Accelerometer vor allem bei Kälbern zur Messung von Veränderungen der Aktivität nach unterschiedlichen schmerzhaften Verfahren Anwendung (WHITE et al., 2008; HEINRICH et al., 2010; COETZEE et al., 2012a; PAULY et al., 2012; THEURER

et al., 2012; OLSON et al., 2016).

Eine weitere Methode zur objektiven Aktivitätsmessung besteht im Gebrauch von Pedometern. Sie stellen eines der am meisten genutzten Sensorsysteme der Milchviehhaltung dar (SHEPLEY et al., 2017) und wurden auch in aktueller Literatur zur Anwendung bei Kälbern beschrieben (MAYER et al., 2020). Ähnlich wie beim Accelerometer kann das Pedometer an einer beliebigen Gliedmaße befestigt werden (CURRAH et al., 2009; PIELER et al., 2013; WHITE et al., 2013; COETZEE et al., 2014b; COETZEE et al., 2014a), wobei die Liege-, Steh- und Gehaktivitäten, einschließlich der Anzahl der Schritte, kontinuierlich aufgezeichnet werden. Die Datenerfassung durch Einsatz von Pedometern wird in zahlreichen Studien, z. B. bei schmerzhaften Eingriffen wie Kastrationen beim Kalb (CURRAH et al., 2009; PIELER et al., 2013; COETZEE et al., 2014b) beschrieben. Laut DEVANT et al. (2012) hat jedoch auch der mit einer Kastration verbunden Stress eine dauerhafte Auswirkung in Form einer reduzierten körperlichen Aktivität zur Folge. Zudem könnte ein Zusammenhang zwischen der von Rindern zurückgelegten Distanz und stressigen bzw. unangenehmen Situationen, wie einer Kastration, bestehen (DŽERMEIKAITĖ et al., 2023). Auch der Stress nach dem Absetzen (HALEY et al., 2005) kann die Anzahl der Schritte bei Kälbern beeinflussen. Nicht zuletzt führt auch Hitze-Stress zu akuten Auswirkungen auf die Aktivität, wobei vermehrte Stehzeiten, ebenso wie längere Ruhezeiten in schattigen Bereichen beobachtet werden konnten (LOVARELLI et al., 2024).

2.1.2.2. Tränkeaufnahme bzw. Futteraufnahme

Die Futteraufnahme kann zur Bewertung von Schmerzen bei Kälbern verwendet werden (BATES et al., 2015; WINDER et al., 2017), wobei auch akute Krankheiten (und die damit verbundenen Schmerzen) zu einer verminderten Futter- und Tränkeaufnahme führen (MILLMAN, 2007). Laut DUTHIE et al. (2021) sind die Unterschiede im Fütterungsverhalten am Höhepunkt der Erkrankung am deutlichsten. Aber auch Stress (SUTHERLAND et al., 2018) und Hitzestress (DADO-SENN et al., 2020) können zu Veränderungen der Milchaufnahme führen.

Die Milchaufnahme von Kälbern wird jedoch auch von vielen anderen Faktoren, unter anderem dem Fütterungsmanagement, dem sozialen Umfeld und der Bereitstellung fester Nahrung beeinflusst (MILLER-CUSHON & DEVRIES, 2015). Beispielsweise kann die Betreuungsperson und die jeweilige Mensch-Tier-

Beziehung einen erheblichen Einfluss auf die Milchaufnahme von Kälbern haben. So besteht laut WAIBLINGER et al. (2003); EBINGHAUS et al. (2018) ein Zusammenhang zwischen Einstellung und Verhalten der Betreuungsperson und dem Grad der Angst des Tieres vor dem Menschen. Die dadurch hervorgerufene hormonelle Stressreaktion geht mit negativen Auswirkungen auf die Leistung, das Wohlbefinden und das Handling einher und ist mit einem erhöhten Risiko für Verletzungen für Tier und Mensch verbunden (MACK, 1980; RUSHEN et al., 1999b; RUSHEN et al., 1999a; LENSINK et al., 2001; HEMSWORTH & COLEMAN, 2010).

2.1.2.3. Cortisol

Das Glucocortikoid Cortisol ist ein Produkt der HPA-Achse, welches eine wesentliche Rolle bei der Regulierung der biologischen Systeme des Körpers spielt (SAPOLSKY et al., 2000; LUPIEN et al., 2009). Cortisol kann in verschiedenen Untersuchungsmaterialien wie Blut, Speichel, Urin und Fäkalien gemessen werden (COOK, 2012). Auch die spezifischen Eigenschaften von Haar-Cortisol als potenzielles Instrument zur Messung der langfristigen Aktivität der HPA-Achse, wurden sowohl in der Humanmedizin (RUSSELL et al., 2012; STALDER & KIRSCHBAUM, 2012) als auch bei Rindern (GONZÁLEZ-DE-LA-VARA MDEL et al., 2011; CREUTZINGER et al., 2017; HEIMBÜRGE et al., 2020) untersucht.

Die Exposition gegenüber Stressoren wird mit einer erhöhten Aktivität der HPA-Achse in Verbindung gebracht, weswegen die Cortisolkonzentrationen im Allgemeinen als Indikator für Stress angesehen werden (DALLMAN et al., 1987; SAPOLSKY et al., 2000). In der Humanmedizin gilt Cortisol als Schlüsselindikator für psychischen Stress (TSIGOS & CHROUSOS, 2002) und Depression (MONROE, 2008; SCHMIDT et al., 2011). Bei Wiederkäuern ist Cortisol der wichtigste objektive Parameter für die Bewertung von Stress, aber auch für Schmerz (COETZEE et al., 2008). Bei Kälbern wurden Messungen der Cortisolkonzentrationen sowohl zur Stressmessung (ZAVY et al., 1992; COOPER et al., 1995; LITTLEJOHN et al., 2016) als auch zur Messung von schmerzbedingten Distress (STILWELL et al., 2008; HEINRICH et al., 2009; OLSON et al., 2016) eingesetzt. Bei der Unterscheidung von Stress und Schmerz zeigt sich eine bedeutsame Einschränkung von Cortisol, da der Cortisolspiegel sowohl durch schmerzbedingten Stress, als auch durch Stress aufgrund von

Handhabung (BOANDL et al., 1989; LESTER et al., 1991), menschlicher Anwesenheit und Bewegungseinschränkung (KARLEN et al., 2019), individuellem und angstbedingtem Verhalten (BRISTOW & HOLMES, 2007) sowie durch Unterschiede im Management oder der äußeren Umgebung (OGINO et al., 2014) ansteigt. Zudem kann eine erhöhte HPA-Aktivität auch durch Stoffwechselprozesse, positive affektive Zustände, Paarungsverhalten und körperliche Aktivität verursacht werden (MORMÈDE et al., 2007; RALPH & TILBROOK, 2016).

Bei der Unterscheidung zwischen Stress und Nozizeption, erwiesen sich gleichzeitige Messungen der Plasmakonzentrationen von Cortisol und SP als hilfreich (COETZEE et al., 2008; KARLEN et al., 2019).

2.1.2.4. Substanz P

SP ist ein sensorischer Neurotransmitter aus der Familie der Tachykinine (DEVANE, 2001), besteht aus 11 Aminosäuren (CHANG et al., 1971) und kann aus Blut (meist Plasma) (TOYODA et al., 2002; COETZEE et al., 2008; RODRIGUEZ et al., 2018), Liquor cerebrospinalis (RUSSELL et al., 1994; GERACIOTI et al., 2006; JOHANSSON et al., 2015) und seltener aus Speichel (NICOLODI & BIANCO, 1990; MAYER, 2019) und Urin (ALTUNTAŞ et al., 2014) gewonnen werden.

In der Humanmedizin gilt SP vorrangig als Vermittler von Nozizeption, spielt jedoch auch bei Entzündungen (XU et al., 2000; O'CONNOR et al., 2004), psychologischem Stress (Depressionen (BONDY et al., 2003; GERACIOTI et al., 2006) posttraumatische Belastungsstörungen (PTBS) (GERACIOTI et al., 2006) und bei stressbedingten Aborten (JOACHIM et al., 2001; TOMETTEN et al., 2004) eine Rolle. Beim Wiederkäuer fehlt Grundlagenforschung. Hier gilt SP als objektiver Parameter zu Messung von Nozizeption (COETZEE et al., 2008) und wurde zum Großteil nur während und nach schmerzhaften Eingriffen untersucht.

2.1.2.5. Glukose

Bei Wiederkäuern wird eine erhöhte Glucosekonzentration im Blut als Folge einer Fluchtreaktion und durch verschiedene Stressfaktoren beschrieben (MUDRON et al., 2005). Die Glukosekonzentrationen können allerdings auch durch verschiedene andere Faktoren beeinflusst werden (SCHOLZ, 1990). Beispielsweise wirkt sich

die Milchaufnahme auf die postprandiale Glukosekinetik (GERRITS, 2019) und somit auf die postprandiale Plasmaglukose bei Milchkälbern aus (GHAFFARI et al., 2017). Weiters kann die Glukosekonzentration bei endogener Glukoseproduktion durch Glukoneogenese in der Leber (HAMMON et al., 2003), durch das Alter von Kälbern (OMIDI-MIRZAEI et al., 2015) und durch das Temperament der einzelnen Tiere (BURDICK SANCHEZ et al., 2016) beeinflusst werden. Verschiedene Studien, die in den letzten Jahren zum Thema Auswirkung von Hitzestress auf den Glukosespiegel durchgeführt wurden, zeigen zudem einen signifikanten Rückgang des Blutzuckerspiegels durch Hitzestress beim Milchvieh (RHOADS et al., 2009; WHEELOCK et al., 2010; BAUMGARD et al., 2011).

2.2. Unterschied zwischen Stress und Nozizeption

Eine genaue Abgrenzung von Nozizeption und Stress ist schwierig, da sich Stress, Schmerz und Angst gegenseitig beeinflussen (HENKE & ERHARDT, 2001). Dabei wirkt Schmerz stark aktivierend auf die Stressreaktion (ULRICH-LAI & HERMAN, 2009). Stress ist ein wichtiger Modulator der Schmerzwahrnehmung und -reaktion (VACHON-PRESSEAU, 2018). Unter normalen Bedingungen sind die Schmerz- und Stressreaktionen adaptive und schützende Prozesse, die sich in Allostase befinden (MCEWEN & WINGFIELD, 2003; MCEWEN, 2017). Bei Überbeanspruchung und Dysregulation solcher Prozesse und als Reaktion auf die kumulative Belastung durch Stressoren (schmerz- oder nicht schmerzbezogen), kann es jedoch zu einer allostatischen Belastung („Verschleiß“) kommen (MCEWEN & WINGFIELD, 2003; GUIDI et al., 2020; RABEY & MOLONEY, 2022).

Beim Wiederkäuer sind subjektive sowie objektive Methoden zur Messung von Schmerz und Stress in vielen Punkten deckungsgleich. Hinzu kommen die stoische Natur von Rindern und das Bemühen, Schmerzen zu verbergen (HUDSON et al., 2008).

Eine Untersuchung von COETZEE et al. (2008) zeigte jedoch zum ersten Mal auf, dass SP als objektiver Biomarker für Nozizeption verwendet werden kann, da die SP-Konzentrationen bei chirurgisch und scheinkastrierten Kälbern signifikante Unterschiede aufwiesen, während es bei den Cortisolkonzentrationen zwischen den Gruppen keine Unterschiede gab. Seitdem werden simultane Messung von Cortisol

und SP empfohlen, um zwischen akutem Stress aufgrund der Handhabung und Stress aufgrund von Nozizeption zu unterscheiden (COETZEE et al., 2008; KARLEN et al., 2019).

3. Substanz P und Stress

3.1. Definition und Historie von Substanz P

SP wurde erstmals 1931 beschrieben als EULER and GADDUM (1931) eine nicht identifizierte Substanz (damals „depressor substance“ genannt) aus Gehirn und Darm von Pferden isolierten, und ihr stark hypotensive Eigenschaften, sowie Effekte auf die Kontraktilität glatter Muskulatur zuschrieben. GADDUM and SCHILD (1934) nannten diesen neuen Wirkstoff Substanz P, wobei sich P auf das nach dem Extraktionsverfahren erhaltene Pulver bezog. LEMBECK (1953) konnte hohe Konzentrationen dieser Substanz in der dorsalen Wurzel des Rückenmarks nachweisen, weswegen SP erstmals mit Schmerzübertragung in Verbindung gebracht und als neuronaler sensorischer Transmitter definiert wurde. Im Jahr 1971 definierte CHANG et al. (1971) die Aminosäuresequenz von SP (aus dem Hypothalamus eines Rindes) als „Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH_2“. Im gleichen Jahr gelang TREGEAR et al. (1971) die erfolgreichen Peptidsynthese von SP, was genauere Untersuchungen zu weiteren Funktionen von SP im Nervensystem ermöglichte. Seit 1983 ist SP als Mitglied der Familie der Tachykinine eingestuft (ERSPAMER, 1983).

In der Humanmedizin wurden umfangreiche Untersuchungen zu SP durchgeführt (RUPNIAK & KRAMER, 1999; DEVANE, 2001; HUNT & MANTYH, 2001) und es existieren zahlreiche Studien die auf eine breite Verteilung von SP im zentralen und peripheren Nervensystem von Säugetieren schließen lassen (CUELLO & KANAZAWA, 1978; CHI et al., 2018; IFTIKHAR et al., 2020), wobei SP von sensorischen Neuronen im dorsalen Horn der Wirbelsäule und im Gehirn freigesetzt wird (HÖKFELT et al., 1975). Darüber hinaus kommt SP in Körperflüssigkeiten wie Blut und Liquor cerebrospinalis vor (KO et al., 2022). SP wird von Nervenzellen synthetisiert und sezerniert (KO et al., 2022) und scheint vorrangig Schmerzsignale zu übertragen und als Vermittler von Nozizeption zu dienen (POTTER et al., 1962; JESSELL, 1982; IVERSEN, 1998). SP konnte auch in nicht-neuronalen Zelltypen, wie murinen Makrophagen (PASCUAL & BOST, 1990;

BOST et al., 1992), humanen Endothelzellen (LINNIK & MOSKOWITZ, 1989; MILNER et al., 1990), eosinophilen Granulozyten (ALIAKBARI et al., 1987) und Leydigzellen aus humanen und murinen Hoden (CHIWAKATA et al., 1991) nachgewiesen werden. Humane Lymphozyten und Monozyten sind zudem in der Lage das SP-Gen zu exprimieren und SP zu produzieren (HO et al., 1997; LAI et al., 1998). Es gibt Hinweise darauf, dass SP physiologische und verhaltensbezogene Stressreaktionen im Gehirn moduliert. Bei Studien an Ratten induzierte SP (nach zentraler Verabreichung) ein Muster von kardiovaskulären und verhaltensbezogenen Reaktionen, die den Reaktionen auf Stressreize ähneln (UNGER et al., 1988; CULMAN & UNGER, 1995) und spielt insbesondere bei PTBS (GERACIOTI et al., 2006) und Depressionen (BONDY et al., 2003; GERACIOTI et al., 2006) eine Rolle.

Bei Wiederkäuern beschrieben COETZEE et al. (2008) SP erstmals als objektiven Biomarker für Nozizeption, der bei schmerzhaften Eingriffen wie Kastration (DOCKWEILER et al., 2013; MINTLINE et al., 2014), Enthornung (ALLEN et al., 2013; STOCK et al., 2016), Nabeloperationen (TSCHONER et al., 2018), Schwanzkupieren (MAYER, 2019) und elektrischer Schmerzstimulation (TSCHONER et al., unpublished) bei Kälbern, sowie Elektroejakulation (WHITLOCK et al., 2012), Ovarektomie (LAUDER et al., 2020) und endoskopischer Abomasopexie (TSCHONER et al., 2020a) beim erwachsenen Rind untersucht wurde. Diese Eingriffe sind allerdings nicht nur schmerzhaft, sondern sie gehen auch mit Stress und Entzündung einher.

3.2. Bisherige Forschungsarbeit zu Substanz P

In der Human- und Labortiermedizin existieren umfassende Studien zur Erforschung von SP, die in vielen Bereichen der Tiermedizin fehlen bzw. rar sind. Im Gegensatz zur Rindermedizin wurde SP in der Humanmedizin in einer Vielzahl von Studien erforscht. Ein Anstieg der SP-Konzentration konnte beispielsweise bei Krankheiten wie Fibromyalgie (RUSSELL et al., 1994) und Alzheimer (JOHANSSON et al., 2015) beobachtet werden, wohingegen die Huntington-Krankheit einen Abfall der SP-Konzentrationen mit sich bringt (EMSON et al., 1980). Bei Parkinson-Patienten kommt es zu einer starken Abnahme von SP-immunoreaktiven Neuronen (GAI et al., 1991).

Beim Pferd beschäftigen sich einige Studien mit der Verteilung von SP im Darm (BURNS & CUMMINGS, 1993; DOMENEGHINI et al., 2004). In den letzten zwei Jahren wurde SP beim Pferd jedoch auch auf seine Eigenschaften als potentieller Stress- (SCHOLLER et al., 2023) bzw. Schmerzmarker (GRUBER et al., 2024) bei Koliken untersucht. Bei Wiederkäuern wurde SP fast ausschließlich zur Messung von Nozizeption eingesetzt. Beginnend mit einer Studie von COETZEE et al. (2008) wurden seitdem verschiedene Studien über schmerzhafte Verfahren bei Rindern und Kälbern durchgeführt. Die SP-Konzentrationen in den Studien variieren jedoch (COETZEE et al., 2008; TSCHONER et al., 2020a). Eine Übersichtsarbeit von TSCHONER and FEIST (2022) bietet eine detaillierte Zusammenfassung verschiedener Eingriffe und deren Auswirkungen auf die SP-Konzentrationen. Die Vergleichbarkeit der SP-Konzentrationen der unterschiedlichen Studien ist durch die Heterogenität des Studiendesigns, der Gruppierung der Tiere und der eingesetzten Verfahren schwierig. Zudem wurden in den meisten Studien zusätzlich zu SP verschiedene andere Parameter zur Beurteilung der Nozizeption verwendet, weswegen die Bewertung von SP nicht im Mittelpunkt der Studien stand (TSCHONER & FEIST, 2022). In Bezug auf die Versuchstiere wurden große Unterschiede in den SP Konzentrationen zwischen den einzelnen Kälbern festgestellt (COETZEE et al., 2008; TSCHONER et al., 2018). Auch das Alter (DOCKWEILER et al., 2013) und das Temperament der Tiere (KASIMANICKAM et al., 2018) haben Auswirkungen auf die SP-Konzentration bei Rindern. Hinweis auf eine altersabhängige Änderung der SP-Konzentration zwischen erwachsenen Rindern und Kälbern gibt eine kürzlich veröffentlichte Studie von LANDINGER et al. (2024), die zeigte, dass adulte Kühe signifikant höhere SP Konzentrationen aufwiesen als Kälber im Alter von 14 bis 21 Tagen.

3.3. Forschung zu Substanz P in Verbindung mit Stress

3.3.1. Forschung zu Substanz P und Stress in der Humanmedizin

Tiermodelle haben gezeigt, dass SP als Reaktion auf Stress freigesetzt wird (DEVANE, 2001). Laut EBNER and SINGEWALD (2006) lösen emotionale Stressoren die In-vivo-Freisetzung von SP in bestimmten Hirnregionen (Amygdala, laterales Septum, Nucleus accumbens, Locus coeruleus) aus, von denen eine Beteiligung an Stress- und Angstmechanismen bekannt ist. Hierbei ist insbesondere

die Amygdala von entscheidender Bedeutung, da diese für die Verarbeitung von Emotionen (einschließlich Furcht und Angst) zuständig ist (AGGLETON, 1993; LEDOUX, 1998), und SP-haltige Neuronen sowie NK1-Rezeptoren in diesem Bereich besonders stark ausgeprägt sind (LJUNGDAHL et al., 1978; ROBERTS et al., 1982; NAKAYA et al., 1994; RIBEIRO-DA-SILVA & HÖKFELT, 2000).

In einer Studie zeigten sich signifikant erhöhte SP-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis von Kriegsveteranen mit schwerer PTSD, im Vergleich zum Liquor gesunder Freiwilliger (GERACIOTI et al., 2006). Der deutliche Anstieg der SP-Konzentration während und nach symptomauslösenden, nicht aber nach neutralen Reizen, deutet darauf hin, dass die Freisetzung von SP im ZNS am Mechanismus der akuten PTBS-Symptome beteiligt ist und SP im ZNS auf akuten psychologischen Stress reagiert (GERACIOTI et al., 2006).

Bei Studien zu SP und ihrer Beteiligung an Depressionen konnte ebenfalls erhöhte SP-Konzentrationen bei depressiven Patient*innen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe beobachtet werden (BONDY et al., 2003; GERACIOTI et al., 2006)

3.3.2. Forschung zu Substanz P und Stress bei Labortieren

Studien zu SP bei Labortieren sind zahlreich. Unter anderem konnte mit Hilfe von Tiermodellen eine Freisetzung von SP als Teil der Reaktion auf Stress aufgezeigt werden (DEVANE, 2001). Ergebnisse einer Studie an Mäusen von JOACHIM et al. (2001) weisen darauf hin, dass ein durch Stress verursachter Abort über SP vermittelt wird. Zudem kann eine Blockade des SP-Rezeptors durch eine verminderte Produktion von TNF-alpha durch CD8+ T-Zellen einem Abort vorbeugen. Diese Ergebnisse zu SP stimmen mit denen einer Studie von TOMETTEN et al. (2004) überein, in der ebenfalls signifikant erhöhte SP-vermittelte Abortraten nach Stresssituationen verzeichnen konnten.

JOACHIM et al. (2006) veröffentlichten eine Studie, die sich mit der Hochregulierung von TNF-alpha durch Stress und SP in einem Mausmodell für allergische Atemwegsentzündungen beschäftigte. Dabei führte Stress in Form von Lärm zu einer Stimulation der SP-Expression in atemwegspezifischen Neuronen.

KAWANA et al. (2006) wollten überprüfen, ob SP an einer stress-induzierten

Degranulation von dermalen Mastzellen beteiligt ist. Sowohl Stress (in Form einer elektrischen Stimulation), als auch emotionaler bzw. psychologischer Stress hatten einen signifikanten Anstieg der Degranulation von dermalen Mastzellen und eine Zunahme der SP-positiven Nervenfasern zur Folge.

Weiters konnte bei Studien an Ratten nachgewiesen werden, dass eine Blockierung von NK-1-Rezeptoren (Besetzung der Bindungsstelle) oder die genetische Störung von NK-1-Rezeptoren (Blockierung der SP-Übertragung) die Auswirkungen von Stress verringern und damit eine anxiolytische und/oder antidepressive Wirkungen erzielt werden kann (EBNER et al., 2008).

3.3.3. Forschung zu Substanz P und Stress bei Pferden

Nach der erstmaligen Isolation von SP aus dem Pferdedarm (EULER & GADDUM, 1931) beschäftigten sich weitere Studien mit der Verteilung und Rolle im Intestinaltrakt des Pferdes. SP konnte später in Neuronen des submukösen Plexus (BURNS & CUMMINGS, 1993; DOMENEGHINI et al., 2004) und in Nervenfasern des Plexus myentericus und der Tunica mucosa (in Verbindung mit der Muscularis mucosae) (DOMENEGHINI et al., 2004) nachgewiesen werden. Dies weist daraufhin hin, dass SP mit einer anregenden Reaktion der Muscularis mucosae in Verbindung gebracht werden kann (DOMENEGHINI et al., 2004).

Neben einer Studie über erhöhte SP-Konzentrationen in osteoarthritischer Gelenke (KIRKER-HEAD et al., 2000) existiert nur wenig Forschung über SP bei Pferden. Ein aktuelle Studie von SCHOLLER et al. (2023) beschäftigt sich mit der Evaluation von SP als Stressmarker. Bei der Studie wurden SP- und Cortisolkonzentrationen während 4 verschiedener Stressstufen (von Stufe 1: mit losem Nasenriemen gerittene Pferde bis Stufe 4: mit engem Nasenriemen und Overground-Endoskop) gemessen. Zwischen den Cortisolkonzentrationen und den unterschiedlichen Stressstufen konnte ein linearer Verlauf beobachtet werden. Es zeigte sich allerdings keine Korrelation zwischen den SP-Konzentrationen und den Stressstufen.

Eine weitere Arbeit untersuchte SP als potentiellen Biomarker für schmerzhafte Zustände bzw. als prognostischen Faktor bei Koliken (GRUBER et al., 2024). Während die Cortisol- und Laktatkonzentrationen mit der Equine Acute Abdominal Schmerz Skala korrelierten, gab es zwischen der Skala und SP keine Korrelation.

Die Autor*innen schließen daraus, dass SP in diesem Fall kein zuverlässiger Parameter zur Schmerzmessung bei Pferd zu sein scheint.

3.3.4. Forschung zu Substanz P und Stress bei Hund und Katze

Bei Hund und Katze fokussiert sich die bisherige Forschung zu SP und deren Anstieg vor allem auf Schmerz (SCHAIBLE et al., 1990; YOON et al., 2019), aber auch auf entzündliche Prozesse (POLIDORO et al., 2017). Im Hinblick auf Stress ist eine Studie von SHAIKH et al. (1993) erwähnenswert, bei welcher die Rolle von SP im defensiven Wutverhalten von Katzen untersucht wurde. Ergebnisse dieser Studie unterstützen die Hypothese, dass die mediale Amygdala einen starken erregenden monosynaptischen Input für den medialen Hypothalamus für die Ausprägung von defensivem Wutverhalten liefert, und dass dieser Mechanismus zumindest teilweise über SP vermittelt wird (SHAIKH et al., 1993). Obwohl der Fokus auf Aggression lag, sind solche Verhaltensweisen oft mit Stress und Angst verbunden, was auf eine indirekte Verbindung zwischen SP und stressbedingtem Verhalten hindeuten kann.

3.3.5. Forschung zu Substanz P und Stress in der Rindermedizin

Zurzeit existiert eine überschaubare Menge an Studien zu SP bei Wiederkäuern. Der Großteil dieser Studien wurde an Kälbern durchgeführt, bei erwachsenen Tieren ist die Datenlage begrenzt. Einen umfangreichen Überblick über an Wiederkäuern durchgeführten Studien zu SP bietet eine Arbeit von TSCHONER and FEIST (2022).

Bisher wurde SP fast ausschließlich in Verbindung mit schmerzhaften Zuständen erfasst. Da sich Schmerz und Stress allerdings gegenseitig beeinflussen (HENKE & ERHARDT, 2001), müssen schmerzhafte Zustände immer als eine Kombination aus Schmerz und Stress angesehen werden. Arbeiten zu Stress als isoliertem Einflussfaktor auf SP wurden bisher nur im Rahmen weniger Studien von VAN ENGEN et al. (2014); VAN ENGEN et al. (2019) durchgeführt.

VAN ENGEN et al. (2014); VAN ENGEN et al. (2019) untersuchten den Einfluss von Transportstress auf Kälber (VAN ENGEN et al., 2019) und Mastbullen (VAN ENGEN et al., 2014), wobei die Tiere entweder über einen Zeitraum von 8 (VAN ENGEN et al., 2019) oder 16 Stunden (VAN ENGEN et al., 2014) transportiert

wurden. In beiden Studien kam es zu einem Anstieg der SP-Konzentrationen direkt nach dem Transport. Bei den Cortisolkonzentrationen gab es keine signifikanten Veränderungen (VAN ENGEN et al., 2019), bzw. einen Abfall (VAN ENGEN et al., 2014). In beiden Studien wurden jeweils zwei Blutproben entnommen – unmittelbar nach dem Transport, und 5 Tage später (VAN ENGEN et al., 2014) bzw. vor und unmittelbar nach dem Transport (VAN ENGEN et al., 2019). Weitere Fragestellungen waren die Wirksamkeit einer vor dem Transport verabreichten Meloxicam-Behandlung auf verschiedene Biomarker und die Morbidität, die Leistung und die Schlachtkörpereigenschaften (VAN ENGEN et al., 2019) und auf den Einfluss auf Krankheiten, wie der Rindergrippe (bovine respiratory disease = BRD) (VAN ENGEN et al., 2014), weshalb der Einfluss von Stress auf SP in diesen Studien nicht uneingeschränkt beurteilt werden kann.

Das Problem der fehlenden Möglichkeit der Vergleichbarkeit verschiedener Studien durch Einsatz von Medikamenten besteht auch bei einer Studie von TSCHONER et al. (2020a). Gegenstand dieser Untersuchung waren die Auswirkungen einer Applikation von Xylazin vor einer endoskopischen Fixation des Labmagens nach Janowitz zur Behebung einer linken Labmagenverlagerung auf verschiedene Stressmarker im Blutplasma, unter anderem Cortisol und SP. Die Cortisolkonzentrationen der mit Xylazin behandelten Tiere waren zu allen Zeitpunkten niedriger als die der mit einem Placebo behandelten Kontrollgruppe. Hinsichtlich SP gab es keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Darüber hinaus wurde in beiden Gruppen zu keinem Zeitpunkt eine Korrelation zwischen den Cortisol- und SP Konzentrationen festgestellt (TSCHONER et al., 2020a).

III. PUBLIKATION

THE INFLUENCE OF ECHOCARDIOGRAPHY AS A STRESSFUL MANIPULATION ON SUBSTANCE P, CORTSIOL, AND BEHAVIOR IN CALVES – A PILOT STUDY

H. Kerber, M. Feist, Y. Zablotski, G. Knubben-Schweizer, T.Tschoner

Clinic for Ruminants with Ambulatory and Herd Health Services at the Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) Munich, Sonnenstrasse 16, 85764 Oberschleissheim, Germany

Research in Veterinary Science 2025; 193: 105751

Research in Veterinary Science 193 (2025) 105751

Contents lists available at ScienceDirect

Research in Veterinary Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rvsc

The influence of echocardiography as a stressful manipulation on substance P, cortisol, and behavior in calves – A pilot study

H. Kerber, M. Feist, Y. Zablotski, G. Knubben-Schweizer, T. Tschoner *

Clinic for Ruminants with Ambulatory and Herd Health Services at the Centre for Clinical Veterinary Medicine, LMU, Munich, Sonnenstrasse 16, 85764, Oberschleissheim, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:
Cattle
Glucose
Ultrasonographic examination
Pain
Simmental

ABSTRACT

The aim of this pilot study was to investigate the effects of a stressful stimulus on plasma substance P concentrations (PSPC), salivary substance P (SSPC), plasma cortisol (PCC), and glucose concentrations, behavioral parameters, and milk intake in calves. Animals in STRESS ($n = 12$) were exposed to restrainment in a crush and ultrasonographic examination. Animals in CON ($n = 12$) remained in their igloo. Sampling was done prior (60 min before, 0 min), during (5 to 30 min), and after stimulation (35 min to 2 h). Activity and milk intake were assessed over 24 h; behavior during the stimulus and at sampling times. PSPC and PCC did not differ between groups. In STRESS, PSPC were significantly lower at 5 and 20 min compared with 60 min before. SSPC were below the sensitivity of the ELISA in 34 % of samples. SSPC were significantly higher in CON compared with STRESS at 0, 5, 10, 20, and 30 min, and at 2 h. In STRESS, SSPC were significantly lower at 30 min compared with 60 min before. There was no correlation between PSPC and SSPC. PCC were significantly higher at 20 min compared with 60 min before in STRESS, and significantly lower at 10 and 25 min compared with 60 min before in CON. Glucose concentrations were significantly lower in STRESS compared with CON at 5 and 10 min and differed significantly within groups. "Ear movement", "limb movement", and "urination" was significantly higher in STRESS compared with CON. Milk intake and activity did not differ between groups.

1. Introduction

In bovine medicine, cortisol has been considered as the predominant objective parameter for the assessment of stress and pain for a long time (Coetzee et al., 2008). However, cortisol levels rise due to both pain-related stress as well as distress due to handling and other factors (Karlen et al., 2021). Previous research showed that simultaneous measurements of plasma concentrations of both substance P (SP) and cortisol should be done to differentiate between stress and nociception (Coetzee et al., 2008; Karlen et al., 2021).

SP is a sensory neurotransmitter of the family of tachykinins (DeVane, 2001) and consists of 11 amino acids (Chang et al., 1971). In 2008, SP has been described as an objective biomarker for nociception in cattle (Coetzee et al., 2008). However, research in human medicine showed that SP also has pro-inflammatory effects (O'Connor et al., 2004) and is considered as an inflammatory marker (Xu et al., 2000). Furthermore, SP regulates the excitability of the nociceptive neurons of the dorsal horn and can be found in specific areas of the neuroaxis, which are involved in the integration of anxiety, stress, and pain (DeVane, 2001). Studies showed that post-traumatic stress disorder (PTSD) (Geracioti et al., 2006) and depression (Bondy et al., 2003) were associated with increased SP levels. (Ebner and Singewald, 2006) demonstrated that emotional stressors trigger the in vivo release of SP in brain areas known to be implicated in stress and anxiety mechanisms. According to (DeVane, 2001), animal models have shown that SP is released as a part of the response to stress. However, all the above-mentioned studies either originate from research in humans or have been conducted in laboratory animals. In bovine medicine, SP has been used as a biomarker for nociception, and its course has been assessed during various painful procedures such as castration (Dockweiler et al., 2013), dehorning (Allen et al., 2013), umbilical surgery (Tschoner et al., 2018), and tail docking (Mayer, 2019) in calves, and electroejaculation (Whitlock et al., 2012), ovariectomy (Lauder et al., 2020), and endoscopic abomasopexy (Tschoner et al., 2020) in adult cattle – all of which are pain- as well as stressful, and result in inflammation. No basic research on SP as a biomarker for nociception in the bovine has been done so far.

Echocardiography is described to be the most useful tool for the

* Corresponding author.
E-mail address: t.tschoner@lmu.de (T. Tschoner).

https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2025.105751
Received 12 March 2025; Received in revised form 2 June 2025; Accepted 5 June 2025
Available online 12 June 2025
0034-5288/© 2025 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

diagnosis of (congenital) heart diseases, and can be easily performed in calves (Mitchell and Schwarzwald, 2016).

The hypothesis of this study was that stress in form of restrainement and an echocardiography result in an increase of cortisol, glucose, heart rate, and respiratory rate, but not substance P. The objectives of this pilot study were to 1) evaluate plasma substance P concentrations (PSPC) in healthy German Simmental calves which were submitted to a stressful stimulus in form of restrainment in a crush and an ultrasonographic examination of the heart, compared with a control group, 2) assess if there is a correlation of SP concentrations in samples taken from blood and saliva (SSPC), and 3) describe plasma cortisol concentrations (PCC), glucose concentrations, and changes to heart rate, respiratory rate, and behavior during and after the trial period.

2. Material and methods

The ethics committee of the government of Upper Bavaria approved all the experimental procedures of the current study (reference number 55.2-2532-Vet_02_20-188). The care and use of all experimental animals complied with local welfare laws, guidelines, and policies. The present study is a pilot study. Therefore, 12 animals were included per group, as recommended by (Hertzog, 2008; Julious, 2005; Van Belle, 2008). Sample collection was done from January 2023 to May 2024. Each animal was subject to a different study day. The experiment was conducted at the Clinic for Ruminants with Ambulatory and Herd Health Services, Bavaria, Germany (48°14′31.202″ N, 11°32′54.469″ E).

2.1. Animals and group assignment

In the present study, a total of 24 calves were included. All calves were male and of the German Simmental breed (at least ≥75 %). Animals were bought from farms in Bavaria, either directly ($n = 2$) or via a market ($n = 22$) in Miesbach, Germany. On the day of purchase, calves were 33 ± 3 (28 to 38) days old and weighing 80.3 ± 6.8 (70 to 105) kg. To be able to assess PSPC concentrations without any interference of nociception or inflammation, all calves needed to be clinically healthy to be included in this study.All animals were clinically examined before being purchased. Immediately after arriving at the Clinic for Ruminants with Ambulatory and Herd Health Services, the calves were subjected to a clinical examination and blood samples were taken for a laboratory blood analysis. Furthermore, all animals where treated with a live vaccine for Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and Bovine Parainfluenza-3 (PI3) infection (2 ml/calf intranasally, Bovilis® Intra-Nasal RSP™ Live, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Germany) (except animals 4, 5 and 6) and vitamin E and selenium (2–4 ml/calf s.c., Vitamin E + Selen, Bela-Pharm gmbH & Co. KG, Vechta, Germany) (except animals 4 and 5) on the day of arrival, and with Diclazuril (1 mg/kg BW orally, Diacox® 2,5 mg/ml, Virbac Tierarzneimittel GmbH, Bad Oldesloe, Germany) (except animals 4, 5 and 6) on the following day. Exclusion criteria for the trial were acute or chronic diseases and/or treatment with an antibiotic or NSAID within 48 h prior to the trial. Treatment of calves with either antibiotics or analgesics prior to the trial is given in Appendix A. The study was conducted as a randomized controlled trial, calves were either allocated to the trial group (STRESS, $n = 12$) or the control group (CON, n = 12). Randomization consisted of a lottery with equal numbers of lots for CON and STRESS in sealed envelopes, which were kept locked. On the day before each trial, one envelope was randomly chosen by one of two authors (TT or MF) for group assignment. Due to the study setting, researchers knew the group assignment of the animals during the trial.

2.2. Housing and husbandry

Calves were housed in individual igloos with visual and hearing contact to other calves. Calves were kept on straw and had free access to water, hay, mineral licks and concentrates during the entire time. Calves bought from local markets were fed with whole milk due to not knowing the feeding management at their original farm, calves originating from the Research- and Teaching Center Achselschwang with milk replacer, which was fed ad libitum at the farm of origin. Depending on the feeding management, all calves were fed 3 (to 6, Achselschwang) times per day (07:00 a.m., 12:00 p.m., 07:00 p.m.) with 3 l (2 l for 6 feeding times) of milk per feeding. Milk intake was determined as volume (liters) of milk. For comparison between groups, milk intake was assessed in percentage. All animals were examined by a veterinarian at least once daily.

2.3. Acclimatization period

Upon request of the government of Upper Bavaria, calves received an acclimatization period of 9.25 ± 2.93 (7 to 15) days until the day of the trial. On the day before the trial day, a clinical examination was carried out and calves were then sedated with xylazine (0.02 mg/kg BM i.v.; XYLAZIN 2 % Bernburg®, Serumwerk Bernburg, DE). The skin was locally infiltrated with 2 ml procaine 2 % (Procasel-2 %, Selectavet, Germany) and a 16-gauge × 15 cm catheter (PUR infusion catheter, Walter Veterinär - Instrumente e. K., Baruth/Mark, Germany) was placed in the right jugular vein. Blood samples were taken to determine PCV, hemoglobin, leukocyte count, total protein, and glucose.

2.4. Experimental setup

On the day of the trial, clinical examination was done at 08:00 a.m. At 08:45 a.m., calves of the STRESS group were brought into the examination room and put into a crush in a standing position, with their heads fixed with a halter. The area around the heart was then clipped. From 09:00 a.m. to 09:30 a.m., animals assigned to STRESS were exposed to a stressful stimulus, which consisted of restrainment in a crush and an ultrasonographic examination of the heart using an ultrasonic device (LOGIQ P6 PRO, GE Healthcare Japan Corporation, Japan) with a cardiac probe. The echocardiography was not done for any diagnostic purposes, as all animals were clinically healthy, but as an additional stressor to the restrainement in the crush. At 09:35 a.m., calves of the control group were moved out of the crush and then led back into the igloo at 09:40 a.m., where they stayed until the end of the trial. Animals of CON remained in their igloo for the whole duration of the trial. The setup of the trial is given in Fig. 1.

2.5. Collection of blood and saliva samples

Schedule of collection of blood and saliva samples is presented in Table 1. Samples are referred to as time from the baseline (60 min before) in hours and minutes. Prior to each blood sampling, the intravenous catheter was flushed with 5 ml of 0.9 % saline. It was then flushed with blood for 3 times, and 5 ml of blood were discarded. Blood samples were then taken with a new syringe and a bloodgas tube, and the catheter was flushed again with 10 ml of 0.9 % saline. Blood samples for assessment of PSPC and PCC were transferred to 2 ml EDTA tubes right after sampling. EDTA tubes for SP samples were spiked with 9 μl aprotinin per tube and were kept in a refrigerator or on ice at all times. Blood samples for both SP and cortisol were kept on ice and brought to the laboratory of the Clinic for Ruminants with Ambulatory and Herd Health Services. All samples were centrifuged within 2 h after blood collection (4 °C, 1600 ×g for 15 min). Blood plasma was kept at −80 °C until analysis.

To investigate a less invasive way of assessing SP concentrations in cattle, saliva samples for SSPC were taken using salivettes (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany), which were put in the calf's mouth to be chewed on for 1 min as described by (Mayer, 2019). These samples were immediately transferred to the laboratory for centrifugation (4 °C, 1000 ×g for 2 min). Aprotinin was added after centrifugation (Mayer, 2019) Samples were stored at −80 °C until analysis.

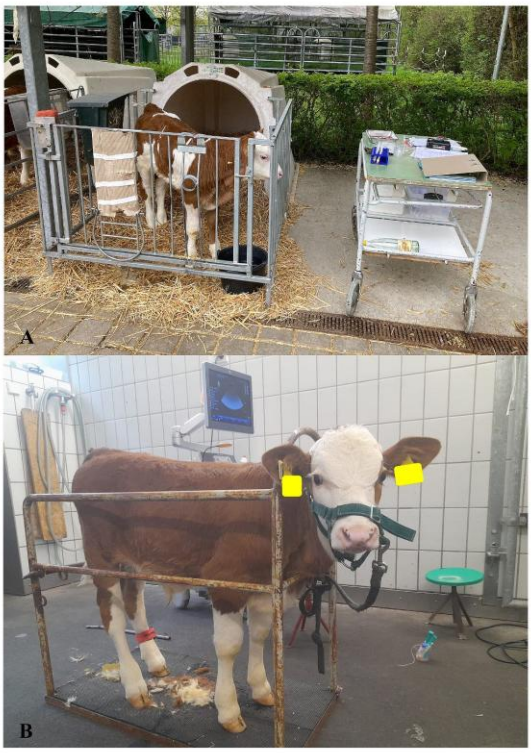

Fig. 1. Experimental setup for the assessment of the effect of a stressful stimulus on substance P, cortisol, and glucose concentrations, as well as behavioral parameters, activity, and milk intake in healthy German Simmental calves. The housing and handling was the same for all calves except during the stressful stimulation. Calves in the control group (A, CON, n = 12) were left in their igloo for the whole duration of the trial. Calves in the trial group (B, STRESS, n = 12) were stressed by being submitted to restrainment in a crush and an ultrasonographic examination of the heart.

Table 1
Schedule of sampling to assess substance P, cortisol, and glucose concentrations in the blood plasma, and substance P concentrations in the saliva in $n = 24$ German Simmental calves submitted to either a stressful or a sham stimulus.

Time	Sample	Procedure
08:00 a.m.	+00:00	Baseline, in igloo
09:00 a.m.	+01:00	Standing in crush
09.05 a.m.	+01:05	Ultrasonographic examination of heart in crush
09:10 a.m.	+01:10	
09:15 a.m.	+01:15	
09:20 a.m.	+01:20	
09:25 a.m.	+01:25	
09:30 a.m.	+01:30	Standing in crush
09:35 a.m.	+01:35	Standing next to crush
09:45 a.m.	+01:45	After being brought back to igloo
10:00 a.m.	+02:00	In igloo
10:30 a.m.	+02:30	
11:00 a.m.	+03:00	

2.6. Substance P, cortisol, and glucose analysis

Determination of PSPC and salivatory SP concentrations were done using a Substance P ELISA kit (ENZO®, Enzo Life Sciences GmbH, DE) as done previously by (Landinger et al., 2024; Tschoner et al., 2020). Optical densities were determined in duplicate, and means were used for the calculation of concentrations. Lower and upper limits of quantification for the Substance P ELISA Kit were 9.8 pg/ml and 9,687.6 pg/ml. The sensitivity was 102.3 pg/ml and the intra- and interassay coefficient of variation was calculated to be <28 %; otherwise, a repeat measurement was performed, with an interassay of 26 %.

For determination of PCC, a Cortisol ELISA Kit (DRG Instruments GmbH, DE) was used. Optical densities were determined in duplicate, and means were used for the calculation of concentrations. Lower and upper limits of quantification for the cortisol ELISA Kit were 153.0 pg/ml and 9910.0 pg/ml. The sensitivity was 501.9 pg/ml and the intra- and interassay coefficient of variation was calculated to be <16 %; otherwise, a repeat measurement was performed, with an interassay of 40 %.

Blood samples for assessment of glucose concentrations were analyzed right after sampling using the RAPIDPoint®500e Blood Gas System (Siemens Healthineers International AG, Zürich, Switzerland). Body temperature for glucose analysis was taken rectally with a thermometer prior to the first blood sample of the trial.

2.7. Assessment of physiological parameters and behavior

Behavioral scoring was done at all sampling times and always by the same person (HK). Behavioral scoring included the assessment of physiological parameters (heart rate (**HR**), using a stethoscope), respiratory rate (**RR**, standing on the right side of the animal and counting the breaths), and an ethogram including the evaluation of behavior, dorsal line of the back, and expression of eyes, nose, and ears, modified according to (Feist et al., 2008; Gleerup et al., 2015). Individual aspects of behavior were recorded as either "yes" or "no" (Appendix B). From 0 min to 35 min (09:00 a.m. to 09:35 a.m.) behavior of the calves was recorded using a video camera (Panasonic HC-V785 Camcorder) to assess the frequency of different parameters over a period of 35 min. Behavioral parameters assessed were movement of the ears and head, limb movements, sequence of movements, tail movements, vocalization, teeth grinding, urinating, or defecation, modified as described by (Rizk et al., 2012) (Appendix C). To limit interobserver bias, video recordings were always evaluated by the same person (HK).

2.8. Activity and number of steps

Activity and number of steps was recorded using a pedometer and analyzed using the associated software (RumiWatch Systems®, Itin and Hoch GmbH, Liestal, Switzerland). The pedometers continuously recorded lying, standing, and walking activity, including number of steps, and have been described for use in calves in recent literature (Mayer, 2019). All calves were fitted with the pedometer at 08:00 a.m. on the trial day. Pedometers were attached on either the left or right hind limb proximal to the fetlock joint. Data recording with the pedometer was done for 24 h until 08:00 a.m. on the day following the trial.

2.9. Statistical analysis

Data analysis was performed using R 4.4.0 (2024-04-24) statistical software. Linear mixed effects models were used to study PSPC, SSPC, PCC, glucose concentrations, HR, and RR. The predictors "time" (60 min before:2 h) and "group" (CON vs. STRESS) were used as fixed effects with an interaction between them and with a random effect of an individual animal due to the repeated measures of every animal over time. Normality and homoscedasticity of residuals were assessed via visual residual-diagnostics after the models fit. Due to the not-normally distributed and heteroskedastic residuals data for PSPC, SSPC and PCC was log-transformed. The generalized linear and robust linear mixed-effects models were conducted for every analysis and compared via Akaike's Information Criterion (AIC) and R^2. The best model was used

for further analysis and post-hoc tests where timepoint and groups were compared. The correlation between PSPC and PCC (across all groups—CON and PAIN—and all timepoints) was assessed using Spearman's correlation on logarithmically transformed data (both PSPC and PCC were logarithmized).

The differences in behavioral and activity parameters and milk intake between unpaired control and stress groups were assessed via the unpaired two sample *t*-test in case of normally distributed data and via Wilcoxon rank sum (Mann-Whitney U) test in case of not normally distributed data. Difference between groups for categorical behavior and activity predictors and milk intake were studied via Fisher's exact tests.

Results with a p-value < 0.05 were considered statistically significant. Due to the exploratory approach of the study and small sample size, correction of the P value for multiple comparisons was not performed, in order to decrease the probability of Type 2 error (missing a discovery).

3. Results

3.1. Clinical examination and laboratory findings on the day before trial

Age of calves on the day prior to the trial was 41 ± 3 (35–46) days. Findings of clinical examination and selected blood parameters are presented in Appendix D.

3.2. Plasma substance P concentrations

A total of 2 analysis of concentrations had to be repeated due to duplicates of optical densities varying more than 15 % ($n = 2$ for CON), and one sample needed to be diluted 1:20 ($n = 1$ for STRESS) because PSPC were exceeding 10,000 pg/ml. Detailed information about missing/repeated data is presented in Appendix E.1.

Mean PSPC (with lower and upper CI) were 828.8 (639.1–1074.9) pg/ml in CON and 757.5 (584.1–982.4) pg/ml in STRESS 60 min before intervention. Course of PSPC concentrations is presented in Fig. 2. In STRESS, PSPC were significantly lower at 5 min (632.7 pg/ml, $p = 0.0400$) and 20 min (632.7 pg/ml, $p = 0.0416$) compared with 60 min before. There were no significant differences between groups at any time point. Mean PSPC concentrations are presented in Appendix F, and further significant differences within groups are given in Appendix G.

3.3. Substance P concentrations in saliva

SSPC were below the sensitivity of the ELISA kit in 106 samples in 12 animals ($n = 22$ for CON and $n = 83$ for STRESS). A total of 10 analysis of concentrations had to be repeated due to duplicates of optical densities varying more than 15 % ($n = 7$ for CON and $n = 4$ for STRESS). Detailed information about missing/repeated data is presented in Appendix E.2.

Mean SSPC (with lower and upper CI) were 38.1 (22.6–64.7) pg/ml in CON, and 22.4 (13.2–38.1) pg/ml in STRESS 60 min before intervention. Course of SSPC concentrations is presented in Fig. 3. In STRESS, SSPC were significantly lower at 30 min (11.8 pg/ml, $p = 0.0223$) compared with 60 min before intervention. SSPC were significantly higher in CON compared with STRESS at 0 min (32.5 and13.5 pg/ml, $p = 0.0211$), 5 min (41.3 and. 13.1 pg/ml, $p = 0.0027$), 10 min (39.3 and 13.3 pg/ml, $p = 0.0047$), 20 min (40.4 and 13.5 pg/ml, $p = 0.0041$), 30 min (40.4 and 11.8 pg/ml, $p = 0.0012$), and 2 h (41.3 and 17.8 pg/ml, $p = 0.0276$). There was no correlation between PSPC and SSPC ($P = 0.12$). Mean SSPC concentrations are presented in Appendix F, and further significant differences within groups are given in Appendix G.

3.4. Correlation between plasma substance P and cortisol concentrations

There was a positive correlation between PSPC and PCC, which was significant ($p < 0.001$, rho = 0.21). In CON, there was a positive correlation with a trend for significance ($p = 0.05$, rho = 0.15). In STRESS, the positive correlation was significant ($p = 0.007$, rho = 0.21).

3.5. Plasma cortisol concentrations

A total of 69 samples in 10 animals needed to be diluted 1:20 ($n = 31$ for CON and $n = 38$ for STRESS). For PCC, a total of 9 analysis of concentrations had to be repeated due to duplicates of optical densities varying more than 15 % ($n = 9$ for CON). Detailed information about missing/repeated data is presented in Appendix E.3.

Mean PCC (with lower and upper CI) were 2059.1 (1032.8–4105.2) pg/ml in CON, and 2038.6 (1022.5–4064.3) pg/ml in STRESS 60 min

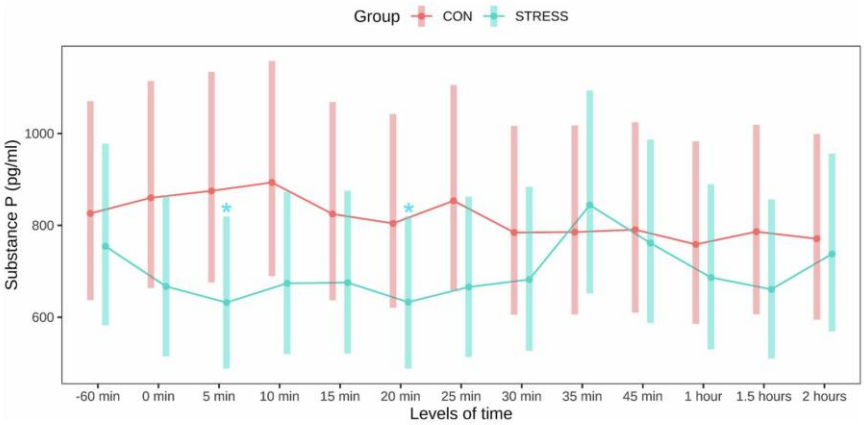

Fig. 2. Course of plasma substance P concentration in calves in CON (n = 12, without stimulus, in red) and STRESS ($n = 12$, stressful stimulus, blue). Points represent mean values with bars representing the 95 % confidence intervals. Basal blood samples were taken at the igloo 60 min (min) before intervention. No stimulus while remaining in the igloo (CON)/stressful stimulation (STRESS) was done from 09:00 a.m. (0 min) to 09:30 a.m. (30 min). (45 min) onwards, animals of STRESS were back in their igloos. There were no significant differences between groups. Significant differences ($p < 0.05$) within groups compared with 60 min before intervention are indicated either with a red (CON) or blue (STRESS) asterisk *. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

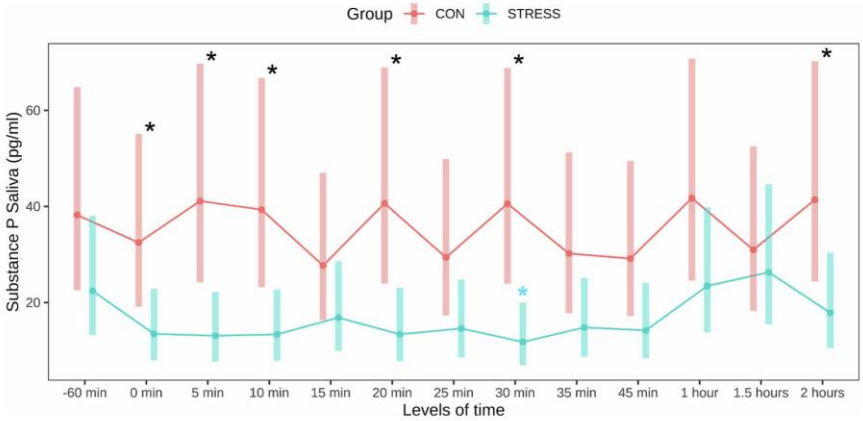

Fig. 3. Course of substance P saliva concentration in calves in CON (n = 12, without stimulus, in red) and STRESS (n = 12, stressful stimulus, blue). Points represent mean values with bars representing the 95 % confidence intervals. Basal blood samples were taken at the igloo 60 min (min) before intervention. No stimulus while remaining in the igloo (CON)/stressful stimulation (STRESS) was done from 09:00 a.m. (0 min) to 09:30 a.m. (30 min). From 09:45 a.m. (45 min) onwards, animals of STRESS were back in their igloos. Significant differences ($p < 0.05$) between groups are indicated with asterisk *, and within groups compared with 60 min before intervention with a red (CON) or blue (STRESS) asterisk *. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

before intervention. Course of SSPC concentrations is presented in Fig. 4. In CON, PCC were significantly lower at 10 min (1236.5 pg/ml, $p = 0.0342$) and 25 min (1164.4 pg/ml, $p = 0.0171$) compared with 60 min before intervention. In STRESS, PCC were significantly higher at 20 min (3294.5 pg/ml, $p = 0.0460$) compared with 60 min before intervention. There were no significant differences between PCC between groups at any time point. Mean PCC concentrations are presented in Appendix H, and further significant differences within groups are given in Appendix G.

3.6. Glucose concentrations in the blood

Mean glucose concentrations (with lower and upper CI) were 6.03 (5.57–6.48) mmol/lt in CON and 6.03 (5.57–6.48) mmol/lt in STRESS 60 min before intervention. Course of glucose concentrations is presented in Fig. 5. In CON, mean glucose concentrations were significantly higher at 0 min (6.51 mmol/lt, $p = 0.0118$) and 5 min (6.42 mmol/lt, $p = 0.0408$) compared with 60 min before intervention. In STRESS, blood glucose concentrations were significantly lower at 20 min (5.62 mmol/lt, $p = 0.0367$), 25 min (5.64 mmol/lt, $p = 0.0452$), 1.5 h (5.57 mmol/lt, $p = 0.0168$), and 2 h (5.47. mmol/lt, $p = 0.0042$) compared with 60 min before intervention. Glucose concentrations were significantly higher in CON compared with STRESS at 5 min (6.42 and 5.74 mmol/lt, $p = 0.0403$) and 10 min (6.33 and 5.67 mmol/lt, $p = 0.0480$). Mean glucose concentrations are presented in Appendix G, and further significant differences within groups are given in Appendix I.

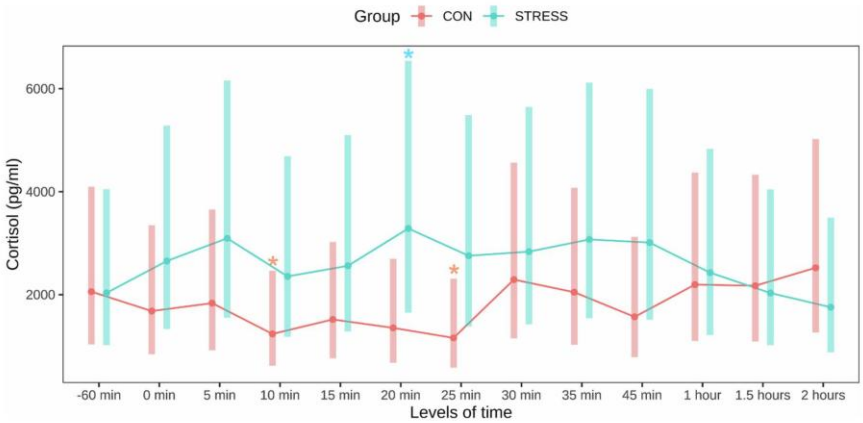

Fig. 4. Course of plasma cortisol concentration in calves in CON (n = 12, without stimulus, in red) and STRESS (n = 12, stressful stimulus, blue). Points present mean values with bars representing the 95 % confidence intervals. Basal blood samples were taken at the igloo 60 min (min) before intervention. No stimulus while remaining in the igloo (CON)/stressful stimulation (STRESS) was done from 09:00 a.m. (0 min) to 09:30 a.m. (30 min). From 09:45 a.m. (45 min) onwards, animals of STRESS were back in their igloos. There were no significant differences between groups. Significant differences ($p < 0.05$) within groups compared with 60 min before intervention are indicated either with a red (CON) or blue (STRESS) asterisk *. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

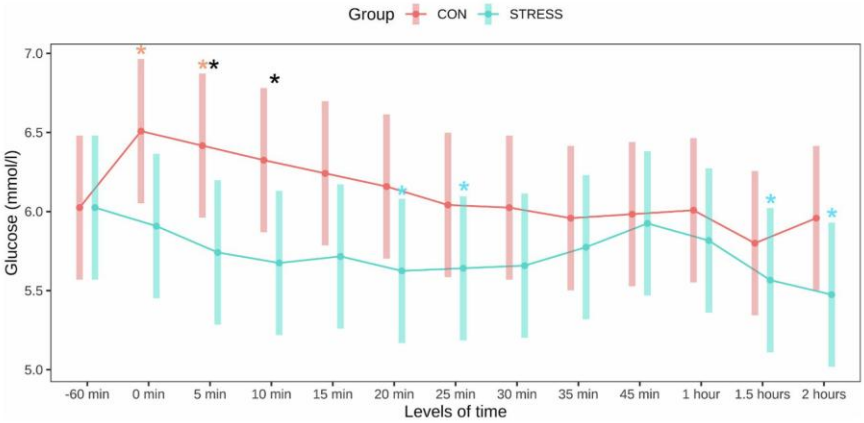

Fig. 5. Course of glucose concentration in calves in CON (n = 12, without stimulus, in red) and STRESS (n = 12, stressful stimulus, blue). Mean glucoses concentrations are given with 95 % confidence intervals. Basal blood samples were taken at the igloo 60 min (min) before intervention. No stimulus while remaining in the igloo (CON)/stressful stimulation (STRESS) was done from 09:00 a.m. (0 min) to 09:30 a.m. (30 min). From 09:45 a.m. (45 min) onwards, animals of STRESS were back in their igloos. Significant differences ($p < 0.05$) between groups are indicated with asterisk *, and within groups compared with 60 min before intervention with a red (CON) or blue (STRESS) asterisk *. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.7. Behavioral scoring during stressful stimulus

Data for behavioral assessment during the stressful stimulus is missing in one animal (18, STRESS) due to technical issues with the camera.

Median frequencies of behavioral parameters evaluated for the duration of either the stressful stimulus (STRESS) or in animals remaining in their igloo (CON) with significant differences are presented in Table 2. Frequency of "ear movements", "movements of limbs", and "urination" was significantly higher in STRESS compared with CON ($p = 0.03$, $p = 0.00343$, and $p = 0.00434$, respectively).

3.8. Physiological parameters on the day of trial

RR assessed for behavior is missing for 18 timepoints due to animals sniffling and investigators not being able to count a RR ($n = 9$ for CON and n = 9 for STRESS). Detailed information about missing/repeated data is presented in Appendix E.4.

Mean HR (with lower and upper CI) was 115.1 (104.8–125) beats/min in CON and 122.6 (112.3–133) beats/min in STRESS. In CON, HR was significantly lower at 10 min (105.5 beats/min, $p = 0.0166$), 25 min (106.1 beats/min, $p = 0.0246$), 35 min (105.4 beats/min, $p = 0.0159$), 45 min (104.6 beats/min, $p = 0.0086$), 1 h (99.5 beats/min, $p = 0.0001$), 1.5 h (104.6 beats/min, $p = 0.0091$), and 2 h (98.6 beats/min, $p \leq 0.0001$) compared with 60 min before intervention. In STRESS, HR was significantly higher at 20 min (131 beats/min, $p = 0.0367$) and 45 min (139.8 beats/min, $p \leq 0.0001$), and significantly lower at 1.5 h (110.6 beats/min, $p = 0.0028$) and 2 h (111.6 beats/min, $p = 0.0058$) compared with 60 min before intervention. HR was significantly higher in. STRESS compared with CON for all time points expect 60 min before, 1.5 h, and 2 h. Mean frequencies of HR with significant differences between groups are presented in Table 3.

Mean RR (with lower and upper CI) was 42.2 (37.1–47.4) breaths/min in CON and 39.7 (34.5–44.8) breaths/min in STRESS. In CON, RR was significantly lower at 2 h (36.8 breaths/min, $p = 0.0164$) compared with 60 min before intervention. In STRESS, RR was significantly higher at 0 min (44.6 breaths/min, $p = 0.0287$), 20 min (44.6 breaths/min, $p = 0.0294$), 25 min (45.8 breaths/min, $p = 0.0067$), 30 min (45.9 breaths/min, $p = 0.0059$), 45 min (47.7 breaths/min, $p = 0.0011$), and 1.5 h (44.3 breaths/min, $p = 0.0380$) compared with 60 min before intervention. There were no significant differences between groups. Mean frequencies of RR with significant differences within groups are presented in Table 3. Further significant differences within groups for HR and RR are given in Appendix I.

Table 2
Behavioral parameters evaluated in animals submitted to a stressful stimulus (STRESS, $n = 12$), compared with animals undergoing no stressful stimulus but remaining in their igloo (CON, $n = 12$). Due to the low number of occurrences within the groups, differences in vocalization and defecation could only be characterized in descriptive terms. The Mann-Whitney U test produced p-values based on rank comparisons, while medians are presented in the table for better understanding.

Parameter	Group		p-Values
	CON (medians)	STRESS (medians)	
Ear movements	116.9	167.2	**p = 0.03**
Movement of the head	3.3	4.4	p = 0.59
Movement of the limbs	31.8	65.9	**p = 0.00343**
Sequence of movements	62.3	43.8	p = 0.06
Tail movements	14.3	23.0	p = 0.12
Teeth grinding	0	0.3	p = 0.09
Urination	0.3	1.5	**p = 0.00434**

Significant differences (<0.05) are presented in bold letters.

3.9. Behavior on the day of trial

Mixed effects models for each of the other assessed parameters (activity, position of head, dorsal line, eyes, nose, ears) did not show any significant differences in dorsal line and nose at the different time points of the trial. Animals in STRESS tended ($p = 0.092$) to show "looks at observer, head held high, ears to front" more often compared with animals in CON. For position of the head, animals in STRESS showed "same height as dorsal line" significantly ($p = 0.049$) more often than animals in STRESS, whereas animals in CON tended to show "below dorsal line" significantly ($p = 0.057$) more often than animals in STRESS. Animals in CON tended ($p = 0.084$) to show "lids half closed" more often than animals in STRESS, whereas animals in STRESS tended ($p = 0.062$) to show "normal, wide eyes" more often compared with animals in CON. Animals in STRESS tended ($p = 0.073$) to show "ears held in normal

Table 3
Mean values and lower and upper confidence intervals (**CI**) of heart rate and respiratory rate in n = 24 calves of the German Simmental Breed, which were either submitted to a sham (CON, n = 12) or a stressful (STRESS, n = 12) stimulus. Significances (**p**) within groups are indicated, compared with baseline 60 min before intervention (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$). Significant differences between groups are indicated.

Time Point	Heart rate (beats/min)			Respiratory rate (breaths/min)		
	CON	STRESS	p	CON	STRESS	p
60 min before	115 (104.8–125)	122.6 (112.3–133)	0.3105	42.2 (37.1–47.4)	39.7 (34.5–44.8)	0.4964
0 min	108.3 (98–119)	125.1 (114.8–135)	**0.0238**	42 (47.2–)	44.6* (39.4–49.8)	0.4859
5 min	108.5 (98.2–119)	124.9 (114.7–135)	**0.0267**	42 (36.7–47.2)	44.1 (38.9–49.2)	0.5776
10 min	105.5* (95.2–116)	130.3 (120.1–141)	**0.0008**	43.6 (38.4–48.8)	44.0 (38.9–49.2)	0.9050
15 min	109.8 (99.5–120)	125.1 (114.8–135)	**0.0394**	42.3 (37–47.5)	43.7 (38.4–48.9)	0.7097
20 min	109.6 (99.3–120)	131* 120.7–141	**0.0039**	44.4 (39.1–49.8)	44.6* (39.4–49.7)	0.9726
25 min	106.1* (95.8–116)	125.8 115.6–136	**0.0078**	42.1 (36.7–47.4)	45.8** (40.6–50.9)	0.3283
30 min	109.8 (99.6–120)	127.5 (117.2–138	**0.0175**	40.4 (35.1–45.6)	45.9** (40.7–51)	0.1425
35 min	105.4* (95.1–116)	129.8 (119.6–140	**0.0010**	40.1 (34.9–45.2)	34.5 (38.2–48.9)	0.3627
45 min	104.6** (94.3–115)	139.8** (129.5–150)	**<0.0001**	41.3 (36–46.5)	47.7** (42.2–53.1)	0.0987
1 h	99.5** (89.2–110)	120.9 (110.6–131)	**0.0039**	38.1 (32.7–43.5)	42.6 (37.3–47.8)	0.2422
1.5 h	104.6** (94.4–115)	110.6** (100.4–121)	0.4191	41.4 (36.3–46.6)	44.3* (39.2–49.5)	0.4318
2 h	98.6** (88.4–109)	111.6** (101.3–122)	0.0818	36.8* (31.7–42)	41.3 (36.1–46.6)	0.2315

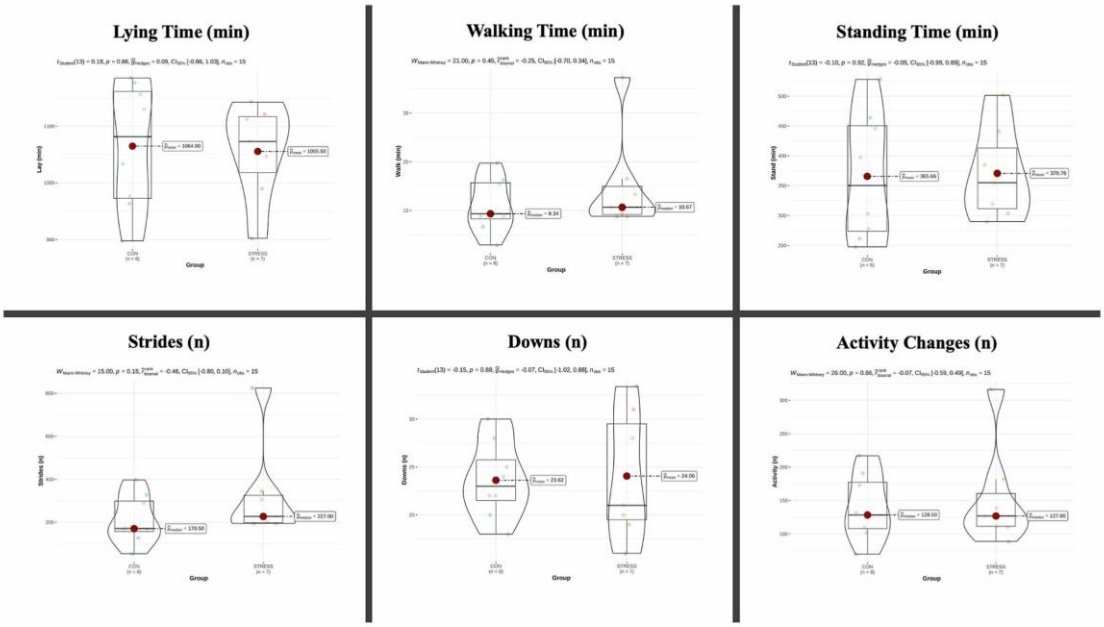

Fig. 6. Activity parameters in calves in CON (n = 12, without stimulus) and STRESS (n = 12, stressful stimulus). Activity was recorded for 24 h, starting at 08:00 a.m. on the day of the trial. Values are given as mean with 95 % Confidence Interval. The box represents 50 % of the data, with the midline being the mean value. The lowest horizontal line (whisker) is the first quartile (Q1) and the highest horizontal line (whisker) is the third quartile (Q3). Dots represent outliners. There were no significant differences in activity parameters between groups. A Student's *t*-test was employed to compare the means between two groups, due to a normally distributed data and equal variances.

position, facing front" more often than animals in CON.

3.10. Activity and number of steps

Activity data is missing in 9 animals ($n = 4$ for CON and $n = 5$ for STRESS), due to technical problems with the pedometer. Detailed information about missing/repeated data is presented in Appendix E.5. Activity data and number of steps is given in Fig. 6. There were no significant differences in activity parameters between CON and STRESS.

3.11. Milk intake

Mean milk intake was 8.7 ± 1.4 (5.6–11.7) liters in CON and 9.1 ± 0.5 (8.5–10.5) liters in STRESS. Percentage of total milk intake did not differ significantly between groups.

4. Discussion

Calves included in this study were 4–6 weeks of age. The age of the calves is one limitation of this study. A study by (Hasan et al., 2017) showed that calves under 6 months of age have a significantly higher risk of contracting diseases. Diarrhea and respiratory diseases were observed as the most frequently occurring diseases in our study population, which is in accordance with (Johnson et al., 2021; Svensson and Liberg, 2006). Nonetheless, this age group was selected for the present study, as most zootechnical procedures such as (surgical) castration and dehorning are normally performed in that age group and lead to pain and stress (Stafford and Mellor, 2005), making basic research work about pain parameters necessary for that age group.

One major limitation of the present study is that calves needed to be clinically healthy to be included in the trial to exclude the influence of nociception, inflammation, or diseases on PSPC. Although all calves were clinically examined before purchase at the market, there was no information about other risk factors for diseases, e.g. colostrum intake, hygiene, temperature and draught, grouping and housing of the animals, and management, and others (Johnson et al., 2021; Lundborg et al., 2005). Further risk factors for diseases were infection pressure due to selling via calf market (Dubé et al., 2010) as well as transportation (Creutzinger et al., 2021). During the acclimatization period at the clinic, animals were initially not subjected to any treatment, but after the first 3 calves were excluded from the trial due to being diagnosed with acute diarrhea on the day of the trial, a standardized prophylactic treatment protocol was implemented. Additionally, blood samples were taken one day before the trial to assess leucocyte count, which has been found to be significantly and positively correlated with PSPC (Landinger et al., 2024). Animals with a leukocyte count well above the reference range would have been excluded from the study. Another exclusion criteria was treatment with an antibiotic or NSAIDs within 48 h prior to the trial, as treatment with analgesics such as metamizole (Tschoner et al., 2018) or Meloxicam (Allen et al., 2013) influence the PSPC in the blood.

Stressful stimulation in our study consisted of restrainment in a crush and an ultrasonographic examination of the heart. According to (Pesenhofer et al., 2006) restraining animals in a crush in a standing position increases cortisol concentrations in adult cows. The ultrasonographic examination of the heart was done as an additional stress stimulus. To keep the stress stimulation constant during our trial, the number of people in the room was always the same, and the ultrasonographic examination was always performed by the same two people (MF, TT).

In the present study, PSPC decreased during the stressful event, with significant differences between 60 min before and 5 min and 20 min, whereas there were no differences in CON. These findings are contrary to those of (Van Engen et al., 2014; Van Engen et al., 2019) who described that SP concentrations in calves increased due to transportation stress. Calves were either transported for 8 (Van Engen et al., 2019) or 16 h (Van Engen et al., 2014), which is a longer exposure to stress compared with the present study. Also, as blood samples were taken immediately after transportation and 5 days later (Van Engen et al., 2014), and before transportation and immediately after transportation (Van Engen et al., 2019), respectively, with no control groups, comparison with our study is not possible. It is possible that the stress stimulus in our study was not strong enough to induce a more pronounced reaction in the animals. (Hwang et al., 2005) showed that stressing rats by restraining them for 2 h increases SP receptor binding in the central amygdala 24 and 48 h after the exposure to stress. Therefore, it is likely that the duration of stress exposure and the severity of the stressor are important factors in the observed effects on SP transmission, at least in the amygdala (Ebner and Singewald, 2006). In other bovine studies, stronger or chronic stress stimuli were used and evaluated. In a work by (Amberger, 2009), calves were restrained in a lateral position for ultrasonic examination, which could be considered a more acute stress stimulus compared with an ultrasonic examination in a crush. However, as (Amberger, 2009) did neither assess PSPC nor PCC, a direct comparison is not possible. (Geracioti et al., 2006) found elevated SP concentrations in the central nervous system in human patients with major depression and PTSD. It is possible that sampling of the cerebrospinal fluid could have provided different results in our study. However, in another human study, an increased B-endorphin plasma concentration, but no changes in PSPC in blood were found after acute stress (Schedlowski et al., 1995). There is evidence that SP modulates physiological and behavioral stress responses in the brain, and that exposure to a variety of emotional, physical, and painful stressors leads to altered SP tissue levels or SP immunoreactivity in different brain regions (Ebner and Singewald, 2006). Therefore, studies of SP concentrations in other matrices than blood and saliva, or analysis of different brain areas during stressful stimulation could provide different results in cattle. Nevertheless, our findings are somewhat in accordance with (Tschoner et al., 2020), who found no differences in PSPC between animals treated with either a placebo or xylazine hydrochloride to reduce stress prior to a laparoscopic fixation of the abomasum. Overall, PSPC in our study were higher compared with PSPC in 14 to 21 days old calves (Landinger et al., 2024). These differences may be age-related, as higher PSPC were found both in older calves (Dockweiler et al., 2013) and adult cattle (Landinger et al., 2024).

There was a positive and significant correlation between PSPC and PCC. Our findings are not in accordance with a recent study by (Tschoner et al., n.d.) who found a significant and negative correlation between PSPC and PCC in calves submitted to repeated painful stimulation. However, a positive and significant correlation has been described for neonatal humans (Dionysakopoulou et al., 2023). (Rohleder et al., 2006) found a trend towards significance between the area under the curve for SP and cortisol following stress in male humans. Another study in humans found a significant correlation between lower cortisol ratios, which was seen as indicative for chronic stress, and the number of SP positive inflammatory cells (Remröd et al., 2007).

Collecting saliva samples is less invasive (Pfaffe et al., 2011) compared with taking blood samples. In the present study, there was no correlation between SSPC and PSPC using the samples which could be analyzed. Comparison with previous research is difficult, as in the only other study assessing SSPC in calves, only two saliva samples were collected (Mayer, 2019). Study results from human medicine differ. (Jasim et al., 2018) found significant differences between SP concentrations in blood and saliva, whereas (Kallman et al., 2018) could not identify a correlation between saliva and plasma concentrations of SP in patients with chronic neuropathic pain. The results of the present study need to be considered with care, as SSPC were below the sensitivity of the ELISA kit in 16 animals and 106 out of 312 samples. As the SSPC samples were analyzed as described by (Mayer, 2019), where all samples were analyzable, it is possible that SP was simply not excreted sufficiently into the saliva in our study. In CON, there was a higher number of analyzable results, which suggests a reduced saliva excretion in stressed

animals. Human medical studies show that stress (Gholami et al., 2017), anxiety, and depression (Gholami et al., 2017) can influence salivary flow rate and lead to xerostomia. Additionally, it is possible that calves chewed the salivettes in different ways, or that the measurement method – using a salivette that was designed for use in humans – was ineffective, even if it had been described by (Mayer, 2019) before. Furthermore, another possible factor influencing SSPC in the present study is that aprotinin, which stabilizes SP, could only be added after sampling and centrifugation of saliva, and had to be adjusted to the quantity of the collected saliva. Fast transfer of samples to the laboratory and the addition of aprotinin was a priority, but human factors may have also led to time differences.

In ruminants, immediate changes in cortisol concentrations are mainly caused by acute pain-related stress, but also by handling (Molony and Kent, 1997), human presence, and restraint (Karlen et al., 2021), as well as by different external conditions and management techniques (Ogino et al., 2013), and individual and fear-related behavior (Bristow and Holmes, 2007). Simultaneous measurements of the plasma concentrations of SP and cortisol has been found to be useful for the differentiation of these two states (Coetzee et al., 2008). In the present study there were no significant differences in PCC between groups, indicating that either the stimulus was not strong enough to stress the calves, or that calves in CON experienced a similar amount of stress as calves in STRESS. (Stilwell et al., 2008) found that cortisol levels are not affected up to 1 min if blood samples are taken immediately after restraining calves by gently pressing them against the barn. As calves in CON sometimes had to be restrained in a similar way to prevent injuries during sampling, restraining could have influenced our results. On the other hand, the lower PCC could also be due to habituation to sampling and human presence. In STRESS, efforts were made to keep the stress stimulus constant; in CON, the aim was to shield the calves from possible external stressors as best as possible. However, as the trial took place during routine clinical work days, various stressors, such as passing personnel or vehicles (CON) and laboratory personnel collecting the SP samples (STRESS) represent a limitation of the study, as the increase in PCC in calves is always dependent on the stressor (Stilwell et al., 2010). As housing, feeding times, daily general examinations, and number of people present during the trial remained constant, the influence of these factors on our study results should be small.

The "fight or flight response" is considered an important mechanism by which an organism reacts to stress or danger (Cannon, 1929), with glucose concentrations rising in the course of the flight response (Mudron et al., 2005). In the present study, the flight reaction and the associated increase in glucose concentration could have been a result of the repeated examinations as well as of the tight sampling schedule. It is noticeable that glucose concentrations were significantly lower in STRESS compared with CON at the beginning of the trial (5 min and 10 min). However, glucose concentrations should be viewed with caution in terms of assessing stress intensity, as they can also be easily influenced by several other factors (Scholz, 1990), such as milk intake, which has an effect on the postprandial glucose kinetics (Gerrits, 2019), and therefore on the postprandial plasma glucose in dairy calves (Ghaffari et al., 2017). The aspect of feeding should also be considered for this study. Variations in concentrate intake could be a reason for the different glucose levels both between and within groups, as concentrates were available ad libitum except for animals in STRESS during the duration of the ultrasonographic examination in the crush. Furthermore, differences in glucose concentrations could be related to the feeding which was set for 07:00 a.m. not always being adhered to in daily clinical routines, resulting in feedings prior or after 07:00 a.m.

In the present study, the HR in STRESS was significantly higher compared with CON at nearly all time points. This result could reflect the increased stress level in STRESS. In CON, the decrease in HR could be related to an adaptation to the human presence and the sampling procedure. HR can also change as a result of individual temperament and reactivity to humans (Kovács et al., 2015), which could have influenced our results.

An increase in RR is an important indicator of stress (Gaughan et al., 2000) and an indirect tool to asses pain (Saeed et al., 2008). The temperature-humidity-index (Thom, 1959), the posture of an animal (Pinto et al., 2019), and diseases (Gaeta et al., 2018), can also have an influence on the RR. In STRESS, the RR was above the basal value, especially during placement in the crush and ultrasonographic examination, indicating that the calves were indeed experiencing stress. Frequency of the other assessed behavioral parameters between groups only showed significant differences in "position of the head", whereby calves of STRESS showed "same height as dorsal line" significantly more often compared with animals in CON. Neck posture in cattle has been poorly investigated (De Oliveira and Keeling, 2018), but (Gleerup, 2017) found that pain often leads to a lower head posture. In our study, this posture and the horizontal position of the head could likely be due to the restriction of movement caused by the crush and being restrained.

STRESS calves showed a significant higher frequency of "ear movements" compared with CON calves. According to (Proctor and Carder, 2014) the relaxed position of the ears is indicative of a positive emotional state in cows. (Reefmann et al., 2009) found a reduced number of ear position changes during positive and an increased number during negative experiences in sheep, which suggests that the calves in STRESS experienced a higher level of negative experiences. "Movement of the limbs" was found significantly more often in STRESS compared with CON, which is in accordance with (Grandin, 1993), who stated that increased movement in cattle is considered as a sign of agitation. However, other factors influencing movement such as social isolation (Boissy and Le Neindre, 1997) and placement of cows in new environments (Hopster, 1998) could also apply to the results of our study. According to (Rushen et al., 1999) social isolation in unfamiliar surroundings increases the incidence of defecation, urination, and/or vocalization. In the present study, we found an increase in urination while standing in the crush in STRESS. One limitation of behavioral assessment was the fact that the video assessment in animals in CON was significantly more difficult compared with animals in STRESS, as calves in CON could retreat into their igloo. Therefore, not all behavioral changes could be recorded and assessed. Constantly forcing the calves out of the igloo would have resulted in stress for the calves, thereby negatively influencing our results. The presence of an observer may also have an impact on the animals' behavior and, consequently, the outcomes of ethograms (Fraser and Broom, 1990). In our case, the trial setup for calves in STRESS required the presence of 3 people. The same amount of people was always present at this stage of the trial to reduce the impact of number of observers on calves' behavior. Since the saliva samples needed to be processed as quickly as possible, the regular collection of the samples by the laboratory staff and the associated repeated entry into the trial room or the approach to the igloo was essential but could have influenced animals' behavior, which is a limitation. Videos and behavior frequency were always evaluated by the same observer (HK). A major limitation to behavior assessment in the present study is,that blinding of group allocation towards the observer was not possible due to the setup of the experimental design. To avoid bias during assessment, blinding is recommended (Fraser and Broom, 1990).

Stress, e.g. following weaning, can influence the number of steps in calves (Haley et al., 2005) and according to (Džermeikaitė et al., 2023) there could be a link between distance traveled by cattle, and stressful and unpleasant procedures. Furthermore, (Boissy and Bouissou, 1995) suggest that reduced locomotor activity in heifers indicates high fearfulness. The activity and number of steps did not differ significantly between groups. As already discussed, this could be related to insufficient stress stimulation. However, differences between the individual animals could also be due to potential diseases that had not yet been diagnosed at the day of trial. A study by (Duthie et al., 2021) found that differences in activity were already evident on the days prior to the peak day of disease. Apart from the ultrasonographic examination where

calves were restrained in the crush, and the moving to and from the igloo to the trial room, all calves were housed in the same way, which makes the influence of environmental factors as described by (Theurer et al., 2012) unlikely. Restrainment and movement of calves in STRESS could be a possible influence on our study results.

Total milk intake did not differ significantly between groups. Stress (Sutherland et al., 2018), as well as heat stress (Dado-Senn et al., 2020) can result in changes of milk intake, and feeding a higher amount of milk increases the sensitivity of feeding behavior as a measure of stress in calves (Sutherland et al., 2018). As feed and milk intake did not differ between control and trial groups, it can be assumed that the stimulus in STRESS was not stressful enough to negatively influence milk intake. Due to the daily work routine in the clinic, different caretakers were responsible for feeding the calves on the individual trial days, which could have influenced milk intake, with some caretakers being more patient and enthusiastic in feeding the calves compared with others.

5. Conclusion

According to the present study, an acute short term stressful event (restrainment in a crush and ultrasonographic examination of the heart for 30 min) results in a decrease in PSPC, with no differences between a trial and a control group. Saliva samples do not appear to be a suitable matrix for assessing SP concentrations in calves, as 34 % of samples could not be analyzed correctly. Using an ethogram, significant increases in ear and limb movement, as well as in frequency of urination in stressed animals could be assessed, indicating that observation of animals is an important and valuable tool to assess an animal's state. Further research in animals submitted to chronic stress should be done to assess the effect of stress on PSPC in the bovine.

CRediT authorship contribution statement

H. Kerber: Writing – original draft, Visualization, Investigation, Data curation. **M. Feist:** Writing – review & editing, Supervision, Methodology, Investigation, Conceptualization. **Y. Zablotski:** Writing – review & editing, Visualization, Software, Methodology, Formal analysis, Data curation. **G. Knubben-Schweizer:** Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Conceptualization. **T. Tschoner:** Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Conceptualization.

Funding

This work was partly supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft [grant numbers 505835300].

Declaration of competing interest

None.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2025.105751.

References

Allen, K.A., Coetzee, J.F., Edwards-Callaway, L.N., Glynn, H., Dockweiler, J., Kukanich, B., Lin, H., Wang, C., Fraccaro, E., Jones, M., Bergamasco, L., 2013. The effect of timing of oral meloxicam administration on physiological responses in calves after cautery dehorning with local anesthesia. J. Dairy Sci. 96 (8), 5194–5205. https://doi.org/10.3168/jds.2012-6251.

Amberger, M., 2009. Echokardiographische untersuchungen von kälbern der rasse deutsches fleckvieh zur ermittlung von referenzwerten und prüfung des einflusses von xylazin und isofluran auf die herzdimensionen. Elektronische Hochschulschriften der LMU München. https://doi.org/10.5282/edoc.11579.

Boissy, A., Bouissou, M.-F., 1995. Assessment of individual differences in behavioural reactions of heifers exposed to various fear-eliciting situations. Appl. Anim. Behav. Sci. 46 (1–2), 17–31.

Boissy, A., Le Neindre, P., 1997. Behavioral, cardiac and cortisol responses to brief peer separation and reunion in cattle. Physiol. Behav. 61 (5), 693–699. https://doi.org/10.1016/S0031-9384(96)00521-5.

Bondy, B., Baghai, T.C., Minov, C., Schüle, C., Schwarz, M.J., Zwanzger, P., Rupprecht, R., Möller, H.-J., 2003. Substance P serum levels are increased in major depression: preliminary results. Biol. Psychiatry 53 (6), 538–542. https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01544-5.

Bristow, D.J., Holmes, D.S., 2007. Cortisol levels and anxiety-related behaviors in cattle. Physiol. Behav. 90 (4), 626–628. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.11.015.

Cannon, W.B., 1929. Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage, 1929. D. Appleton and Company, New York; London. https://doi.org/10.1037/10013-000.

Chang, M.M., Leeman, S.E., Niall, H.D., 1971. Amino-acid sequence of substance P. Nat. New Biol. 232 (29), 86–87. https://doi.org/10.1038/newbio232086a0.

Coetzee, J.F., Lubbers, B.V., Toerber, S.E., Gehring, R., Thomson, D.U., White, B.J., Apley, M.D., 2008. Plasma concentrations of substance P and cortisol in beef calves after castration or simulated castration. Am. J. Vet. Res. 69 (6), 751–762. https://doi.org/10.2460/ajvr.69.6.751.

Creutzinger, K., Pempek, J., Habing, G., Proudfoot, K., Locke, S., Wilson, D., Renaud, D., 2021. Perspectives on the management of surplus dairy calves in the United States and Canada. Front. Vet. Sci. 8, 661453. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.661453.

Dado-Senn, B., Ouellet, V., Dahl, G.E., Laporta, J., 2020. Methods for assessing heat stress in preweaned dairy calves exposed to chronic heat stress or continuous cooling. J. Dairy Sci. 103 (9), 8587–8600. https://doi.org/10.3168/jds.2020-18381.

De Oliveira, D., Keeling, L.J., 2018. Routine activities and emotion in the life of dairy cows: integrating body language into an affective state framework. PloS One 13 (5), e0195674. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195674.

Devane, C.L., 2001. Substance P: a new era, a new role. Pharmacotherapy 21, 1061–1069. https://doi.org/10.1592/phco.21.13.1061.34612.

Dionysakopoulou, C., Lianou, L., Boutopoulou, B., Giannakopoulou, M., Vlachioti, E., Koumpagioti, D., Bozas, E., Matziou, V., 2023. The role of substance P, neurokinin A, neuropeptide Y, and cortisol in assessing neonatal pain. Neonatal Netw. 42 (2), 65–71. https://doi.org/10.1891/nn.2022-0006.

Dockweiler, J.C., Coetzee, J.F., Edwards-Callaway, L.N., Bello, N.M., Glynn, H.D., Allen, K.A., Theurer, M.E., Jones, M.L., Miller, K.A., Bergamasco, L., 2013. Effect of castration method on neurohormonal and electroencephalographic stress indicators in Holstein calves of different ages. J. Dairy Sci. 96 (7), 4340–4354. https://doi.org/10.3168/jds.2012-6274.

Dubé, C., Ribble, C., Kelton, D., 2010. An analysis of the movement of dairy cattle through 2 large livestock markets in the province of Ontario. Canada. Can. Vet. J. 51 (11), 1254–1260.

Duthie, C.A., Bowen, J.M., Bell, D.J., Miller, G.A., Mason, C., Haskell, M.J., 2021. Feeding behaviour and activity as early indicators of disease in pre-weaned dairy calves. Animal 15 (3), 100150. https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100150.

Džermeikaitė, K., Bačėninaitė, D., Antanaitis, R., 2023. Innovations in cattle farming: application of innovative technologies and sensors in the diagnosis of diseases. Animals 13 (5). https://doi.org/10.3390/ani13050780.

Ebner, K., Singewald, N., 2006. The role of substance P in stress and anxiety responses. Amino Acids 31 (3), 251–272. https://doi.org/10.1007/s00726-006-0335-9.

Feist, M., Koestlin, R., Nuss, K., 2008. Claw surgery in cattle: the benefit of perioperative analgesics. Tierarzt. Prax. Ausg. G. 36 (6), 367–376. https://doi.org/10.1055/s-0038-1623861.

Fraser, A., Broom, D., 1990. In: Fraser, A.F., Broom, D.M. (Eds.), Farm Animal Behaviour and Welfare, 3ed. CAB International, pp. 7–16. in Farm animal behaviour and welfare.

Gaeta, N.C., Ribeiro, B.L.M., Alemán, M.A.R., Yoshihara, E., Nassar, A.F.C., Marques, L. M., Timenetsky, J., Gregory, L., 2018. Bacterial pathogens of the lower respiratory tract of calves from Brazilian rural settlement herds and their association with clinical signs of bovine respiratory disease. Pesq. Vet. Bras. 38 (03). https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5323.

Gaughan, J., Sm, H., Hahn, G., Mader, T., Ra, E., 2000. Respiration rate—is it a good measure of heat stress in cattle? J. Anim. Sci. 13, 329–332.

Geracioti, T.D., Carpenter, L.L., Owens, M.J., Baker, D.G., Ekhator, N.N., Horn, P.S., Strawn, J.R., Sanacora, G., Kinkead, B., Price, L.H., Nemeroff, C.B., 2006. Elevated cerebrospinal fluid substance P concentrations in posttraumatic stress disorder and major depression. Am. J. Psychiatry 163 (4), 637–643. https://doi.org/10.1176/ajp.2006.163.4.637.

Gerrits, W.J.J., 2019. Symposium review: macronutrient metabolism in the growing calf. J. Dairy Sci. 102 (4), 3684–3691. https://doi.org/10.3168/jds.2018-15261.

Ghaffari, M.H., Macpherson, J.A.R., Berends, H., Steele, M.A., 2017. Diurnal variation of NMR based blood metabolites in calves fed a high plane of milk replacer: a pilot study. BMC Vet. Res. 13 (1), 271. https://doi.org/10.1186/s12917-017-1185-2.

Gholami, N., Hosseini Sabzvari, B., Razzaghi, A., Salah, S., 2017. Effect of stress, anxiety and depression on unstimulated salivary flow rate and xerostomia. J. Dent. Res. Dent 11 (4), 247–252. https://doi.org/10.15171/joddd.2017.043.

Gleerup, K., 2017. Identifying pain behaviors in dairy cattle. In: Conference: Western Canadian Dairy Seminar at Red Deer, Alberta, Canada, volume: 35.

Gleerup, K.B., Andersen, P.H., Munksgaard, L., Forkman, B., 2015. Pain evaluation in dairy cattle. Appl. Anim. Behav. Sci. 171, 25–32.

Grandin, T., 1993. Behavioral agitation during handling of cattle is persistent over time. Appl. Anim. Behav. Sci. 36 (1), 1–9. https://doi.org/10.1016/0168-1591(93)90094-6.

Haley, D.B., Bailey, D.W., Stookey, J.M., 2005. The effects of weaning beef calves in two stages on their behavior and growth rate. J. Anim. Sci. 83 (9), 2205–2214. https://doi.org/10.2527/2005.8392205x.

Hasan, I., Noman, Z., Sikder, D.M., Sachi, S., Arif, M., 2017. Prevalence of calf diseases in different dairy farms of Bangladesh. BD Vet. Med. Rec. 3, 19–26.

Hertzog, M.A., 2008. Considerations in determining sample size for pilot studies. Res. Nurs. Health 31 (2), 180–191. https://doi.org/10.1002/nur.20247.

Hopster, H., 1998. Coping Strategies in Dairy Cows. Wageningen University and Research.

Hwang, B.H., Katner, J., Iyengar, S., 2005. Corticotropin-releasing factor mRNA and substance P receptor binding in the paraventricular hypothalamic nucleus, central nucleus of the amygdala, and locus coeruleus of Sprague-Dawley rats following restraint-induced stress. J. Mol. Neurosci. 25 (3), 239–250. https://doi.org/10.1385/jmn:25:3:239.

Jasim, H., Carlsson, A., Hedenberg-Magnusson, B., Ghafouri, B., Ernberg, M., 2018. Saliva as a medium to detect and measure biomarkers related to pain. Sci. Rep. 8 (1), 3220. https://doi.org/10.1038/s41598-018-21131-4.

Johnson, K.F., Chancellor, N., Wathes, D.C., 2021. A cohort study risk factor analysis for endemic disease in pre-weaned dairy heifer calves. Animals 11 (2), 378. https://doi.org/10.3390/ani11020378.

Julious, S., 2005. Sample size of 12 per group rue of thumb for a pilot study. Pharm. Stat. 4, 287–291. https://doi.org/10.1002/pst.185.

Kallman, T.F., Ghafouri, B., Bäckryd, E., 2018. Salivary beta-endorphin and substance P are not biomarkers of neuropathic chronic pain propensity. Heliyon 4 (8). https://doi.org/10.1016/j-heliyon.2018e00718.

Karlen, K.J., Baier, F.S., Odegard, S.L., Baumann, R.M., Coetzee, J.F., Kehoe, S.I., Vogel, K.D., 2021. Efficacy of oral meloxicam as primary pain mitigation following caustic paste disbudding of three day old Holstein calves(1). Transl. Anim. Sci. 5 (2), txz151. https://doi.org/10.1093/tas/txz151.

Kovács, L., Kézér, F.L., Tőzsér, J., Szenci, O., Póti, P., Pajor, F., 2015. Heart rate and heart rate variability in dairy cows with different temperament and Behavioural reactivity to humans. PloS One 10 (8), e0134792.

Landinger, A., Zablotski, Y., Knubben-Schweizer, G., Tschoner, T., 2024. Comparison of plasma substance P concentrations in the blood of healthy male and female German Simmental calves. BMC Vet. Res. 20 (1), 226. https://doi.org/10.1186/s12917-024-04010-1.

Lauder, J.K., Marti, S., Schwartzkopf-Genswein, K.S., Jelinski, M.D., Janzen, E.D., 2020. Measuring behavioral and physiological responses to pain mitigation for ovariectomy in Bos taurus yearling beef heifers. J. Anim. Sci. 98 (1). https://doi.org/10.1093/jas/skz386.

Lundborg, G.K., Svensson, E.C., Oltenacu, P.A., 2005. Herd-level risk factors for infectious diseases in Swedish dairy calves aged 0–90 days. Prev. Vet. Med. 68 (2), 123–143. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.11.014.

Mayer, C., 2019. Untersuchungen zur Schmerzäußerung bei Kälbern nach Schwanzspitzenamputation. Elektronische Hochschulschriften der LMU München. https://doi.org/10.5282/edoc.25316.

Mitchell, K.J., Schwarzwald, C.C., 2016. Echocardiography for the assessment of congenital heart defects in calves. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 32, 37–54. https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2015.09.002.

Molony, V., Kent, J.E., 1997. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. J. Anim. Sci. 75 (1), 266–272. https://doi.org/10.2527/1997.751266x.

Mudron, P., Rehage, J., Sallmann, H.-P., Höltershinken, M., Scholz, H., 2005. Stress response in dairy cows related to blood glucose. Acta Vet. Brno 74. https://doi.org/10.2754/avb200574010037.

O`connor, T.M., O`connell, J., O`brien, D.I., Goode, T., Bredin, C.P., Shanahan, F., 2004. The role of substance P in inflammatory disease. J. Cell. Physiol. 201 (2), 167–180. https://doi.org/10.1002/jcp.20061.

Ogino, M., Matsuura, A., Yamazaki, A., Irimajiri, M., Suzuki, Y., Kushibiki, S., Singu, H., Kasuya, E., Hasegawa, Y., Hodate, K., 2013. Plasma cortisol and prolactin secretion rhythms in cattle under varying external environments and management techniques. Anim. Sci. J. 85 (1), 58–68. https://doi.org/10.1111/asj.12090.

Pesenhofer, G., Palme, R., Pesenhofer, R.M., 2006. Comparison of two methods of fixation during functional claws trimming—walk-in crush versus tilt table—in dairy cows using faecal cortisol metabolite concentrations and daily milk yield as parameters [in German]. Wien. Tierarztl. Monatsschr. 93, 288–294.

Pfaffe, T., Cooper-White, J., Beyerlein, P., Kostner, K., Punyadeera, C., 2011. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. Clin. Chem. 57 (5), 675–687. https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.153767.

Pinto, S., Hoffmann, G., Ammon, C., Amon, B., Heuwieser, W., Halachmi, I., Banhazi, T., Amon, T., 2019. Influence of barn climate, body postures and milk yield on the respiration rate of dairy cows. Ann. Anim. Sci. 19 (2), 469–481. https://doi.org/10.2478/aoas-2019-0006.

Proctor, H.S., Carder, G., 2014. Can ear postures reliably measure the positive emotional state of cows? Appl. Anim. Behav. Sci. 161, 20–27. https://doi.org/10.1016/j.applanim.2014.09.015.

Reefmann, N., Bütikofer Kaszàs, F., Wechsler, B., Gygax, L., 2009. Ear and tail postures as indicators of emotional valence in sheep. Appl. Anim. Behav. Sci. 118 (3), 199–207. https://doi.org/10.1016/j.applanim.2009.02.013.

Remröd, C., Lonne-Rahm, S., Nordlind, K., 2007. Study of substance P and its receptor neurokinin-1 in psoriasis and their relation to chronic stress and pruritus. Arch. Dermatol. Res. 299 (2), 85–91. https://doi.org/10.1007/s00403-007-0745-x.

Rizk, A., Herdtweck, S., Offinger, J., Meyer, H., Zaghloul, A., Rehage, J., 2012. The use of xylazine hydrochloride in an analgesic protocol for claw treatment of lame dairy cows in lateral recumbency on a surgical tipping table. Vet. J. 192 (2), 193–198. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.05.022.

Rohleder, N., Wolf, J.M., Herpfer, I., Fiebich, B.L., Kirschbaum, C., Lieb, K., 2006. No response of plasma substance P, but delayed increase of interleukin-1 receptor antagonist to acute psychosocial stress. Life Sci. 78 (26), 3082–3089. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.12.016.

Rushen, J., Boissy, A., Terlouw, E.M.C., De Passillé, A.M.B., 1999. Opioid peptides and behavioral and physiological responses of dairy cows to social isolation in unfamiliar surroundings. J. Anim. Sci. 77 (11), 2918–2924. https://doi.org/10.2527/1999.77112918x.

Saeed, D., Zahr, R., Shalli, S., Fumoto, H., Horai, T., Anzai, T., Arakawa, Y., Dessoffy, R., Catanese, J., Golding, L.A., Fukamachi, K., 2008. Median sternotomy approach for chronic bovine experiments. ASAIO J. 54 (6), 585–588. https://doi.org/10.1097/MAT.0b013e31818a30d9.

Schedlowski, M., Flüge, T., Richter, S., Tewes, U., Schmidt, R.E., Wagner, T.O., 1995. Beta-endorphin, but not substance-P, is increased by acute stress in humans. Psychoneuroendocrinology 20 (1), 103–110. https://doi.org/10.1016/0306-4530(94)00048-4.

Scholz, H., 1990. Stoffwechselkontrolle in der Milchkuhherde an Hand von Blut und Milchparametern. Prakt. Tierarzt. 72, 32–35.

Stafford, K.J., Mellor, D.J., 2005. The welfare significance of the castration of cattle: a review. N. Z. Vet. J. 53 (5), 271–278. https://doi.org/10.1080/00480169.2005.36560.

Stilwell, G., Lima, M.S., Broom, D.M., 2008. Comparing plasma cortisol and behaviour of calves dehorned with caustic paste after non-steroidal-anti-inflammatory analgesia. Livest. Sci. 119 (1–3), 63–69. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.02.013.

Stilwell, G., Carvalho, R.C., Carolino, N., Lima, M.S., Broom, D.M., 2010. Effect of hot-iron disbudding on behaviour and plasma cortisol of calves sedated with xylazine. Res. Vet. Sci. 88 (1), 188–193. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.06.012.

Sutherland, M., Lowe, G., Huddart, F., Waas, J., Stewart, M., 2018. Measurement of dairy calf behavior prior to onset of clinical disease and in response to disbudding using automated calf feeders and accelerometers. J. Dairy Sci. 101 (9), 8208–8216. https://doi.org/10.3168/jds.2017-14207.

Svensson, C., Liberg, P., 2006. The effect of group size on health and growth rate of Swedish dairy calves housed in pens with automatic milk-feeders. Prev. Vet. Med. 73 (1), 43–53. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.08.021.

Theurer, M.E., White, B.J., Coetzee, J.F., Edwards, L.N., Mosher, R.A., Cull, C.A., 2012. Assessment of behavioral changes associated with oral meloxicam administration at time of dehorning in calves using a remote triangulation device and accelerometers. BMC Vet. Res. 8, 48. https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-48.

Thom, E.C., 1959. The discomfort index. Weatherwise 12 (2), 57–61. https://doi.org/10.1080/00431672.1959.9926960.

Tschoner, T., Behrend-Wippermann, M., Rieger, A., Metzner, M., Knubben-Schweizer, G., Reichmann, F., Feist, M., 2018. Course of plasma substance P concentrations during umbilical surgery in calves. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 11-12, 522–528. https://doi.org/10.2376/0005-9366-17103.

Tschoner, T.S., Zablotski, Y., Knubben-Schweizer, G., Feist, M., 2020. Effect of xylazine administration before laparoscopic abomasopexy to correct left displaced abomasum on markers of stress in dairy cows. J. Dairy Sci. 103 (10), 9318–9331. https://doi.org/10.3168/jds.2020-18523.

Tschoner, T., Kerber, H., Zablotski, Y., Knubben-Schweizer, G. & Feist, M. The influence of acute peripheral electrical stimulation on substance P, cortisol, and behavior in calves – a pilot study, unpublished, submitted for publication at Research in Veterinary Science.

Van Belle, G., 2008. Statistical Rules of Thumb, 699. Wiley series in probability and statistics.

Van Engen, N.K., Stock, M.L., Engelken, T., Vann, R.C., Wulf, L.W., Karriker, L.A., Busby, W.D., Lakritz, J., Carpenter, A.J., Bradford, B.J., Hsu, W.H., Wang, C., Coetzee, J.F., 2014. Impact of oral meloxicam on circulating physiological biomarkers of stress and inflammation in beef steers after long-distance transportation. J. Anim. Sci. 92 (2), 498–510. https://doi.org/10.2527/jas.2013-6857.

Van Engen, N.K., Engelken, T.J., Lockard, C.G., Lakritz, J., Cernicchiaro, N., Wilson, B.K., Krehbiel, C.R., Coetzee, J.F., 2019. The effects of pretransportation or arrival meloxicam administration to calves entering the feedlot on morbidity, biomarkers, performance, and carcass characteristics. Transl Anim Sci 3 (2), 620–632. https://doi.org/10.1093/tas/txz070.

Whitlock, B.K., Coffman, E.A., Coetzee, J.F., Daniel, J.A., 2012. Electroejaculation increased vocalization and plasma concentrations of cortisol and progesterone, but not substance P, in beef bulls. Theriogenology 78 (4), 737–746. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.020.

Xu, G.Y., Huang, L.Y., Zhao, Z.Q., 2000. Activation of silent mechanoreceptive cat C and Adelta sensory neurons and their substance P expression following peripheral inflammation. J. Physiol. 528 (Pt 2), 339–348. https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00339.x.

Appendix A: Treatment of calves (ID is number of animal) with either antibiotics (40 mg/kg body weight, subcutaneously, Nuflor® Minidose 450 mg/ml, MSD, Unterschleißheim, Germany (n = 13) or Fenflor 300 mg/ml, KRKA, Austria (n = 3), or analgesics (Meloxicam, 0.5 mg/kg body weight subcutaneously, Melosolute, CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Germany; Metamizol-Natrium, 20 – 40 ml/kg body weight intravenously, Novaminsulfon, Albrecht GmbH, Aulendorf, Germany). Exclusion criteria for the trial were acute or chronic diseases and treatment with an antibiotic or NSAID within 48 hours prior to the trial.

ID	Diagnosis	Treatment day	Treatment	Trial Day
4	Bronchopneumonia	20.04.2024 18.04.2024	Florfenicol Meloxicam	25.04.2023
5	Bronchopneumonia	19.04.2024 19.04.2024 19.04.2024	Meloxicam Metamizol-Natrium Florfenicol	26.04.2023
6	Bronchopneumonia, Diarrhea	09.05.2024 15.05.2024 16.05.2024	Florfenicol, Meloxicam Meloxicam Meloxicam	11.05.2023
7	Anemia, Myodistrophia, Bronchopneumonia	09.05.2024	Florfenicol, Meloxicam	12.05.2023
8	-	-	-	15.06.2023
9	-	-	-	16.06.2023
10	Diarrhea	25.06.2024	Meloxicam	29.06.2023
11	Bronchopneumonia	25.06.2024 26.06.2024 28.06.2024	Meloxicam Florfenicol, Meloxicam, Metamizol-Natrium Meloxicam	30.06.2023
12	-	-	-	20.07.2023
13	-	-	-	21.07.2023
14	Bronchopneumonia	10.09.2024	Florfenicol, Meloxicam	14.07.2023
15	Bronchopneumonia	10.09.2024	Florfenicol	15.09.2023
16	Bronchopneumonia	15.10.2024	Florfenicol	12.10.2023
17	Bronchopneumonia, Diarrhea	10.10.2024	Florfenicol	13.10.2023
18	Bronchopneumonia	29.10.2024 30.10.2024	Florfenicol Meloxicam	02.11.2023

Continuing Appendix 1:

19	Bronchopneumonia	29.10.2024 30.10.2024	Florfenicol Meloxicam	03.11.2023
20	Bronchopneumonia	19.11.2024	Florfenicol, Meloxicam	30.11.2023
21	Bronchopneumonia	19.11.2024	Florfenicol, Meloxicam	01.12.2023
22	-	-	-	14.03.2024
23	Diarrhea	11.03.2024 16.03.2024	Meloxicam Meloxicam	15.03.2024
24	Bronchopneumonia	12.03.2024	Florfenicol, Meloxicam	19.03.2024
25	-	-	-	25.04.2024
26	Bronchopneumonia	21.04.2024	Florfenicol, Meloxicam	26.04.2024
27[1]	Injection damage, minor cuts to the back of the left ankle, selenium deficiency	19.04.2024 21.04.2024	Florfenicol , Meloxicam Florfenicol	03.05.2024

[1] Injury on the day of admission, therefore 2x the i.m. dose.

Appendix B: Parameters to assess behavior and facial expressions in calves before, during and after a stressful stimulus (STRESS) or without stimulus (CON) to evaluate plasma substance P concentrations and saliva substance P concentration (modified as described by Feist et al (2008) and Gleerup et al. (2015)). Parameters were assessed at each blood/saliva sampling time.

Parameter	Present	Timing												
		60 min before	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min	35 min	45 min	1 hour	1.5 hours	2 hours
Heart Rate														
Heart Rate (beats per minute)	-													
Breathing Rate														
Breathing Rate (Breaths per minute, no value if sniffing)	-													
Behavior of Animal (Head)														
Looks at observer, head held high, ears to front	Yes/No													
Looks at observer, ears back	Yes/No													
Doesn't look at observer, head down, ears back	Yes/No													
Position of Head														
Head held high, physiologic position	Yes/No													
Same height as dorsal line	Yes/No													
Below dorsal line	Yes/No													
Dorsal Line														
Straight, physiologic	Yes/No													
Mildly arched	Yes/No													
Severely arched	Yes/No													
Eyes														
Normal, wide eyes	Yes/No													
Lids half closed	Yes/No													
Eyes closed	Yes/No													
Dropping eyelids	Yes/No													
Eyes wide open	Yes/No													
Eyes popping out of head	Yes/No													
Dull, staring eyes	Yes/No													
Rotating bulb, nystagmus	Yes/No													
Nose														
Clean, wet nose	Yes/No													
Dry nose	Yes/No													
Wide nostrils	Yes/No													
Unclean, „dirty" nose	Yes/No													
Wrinkling of skin at back of nose	Yes/No													
Ears														
Ears held in normal position, facing front	Yes/No													
Both ears facing back	Yes/No													
Frequent moving of ears	Yes/No													
Ears low	Yes/No													
Reduced reaction to noise	Yes/No													

Appendix C: Parameters (modified as described by Rizk et al. 2012) to assess behavior of calves during a stressful stimulus (STRESS) or without stimulus (CON) to evaluate plasma substance P concentrations and saliva substance P concentrations. Behavioral parameters were recorded with a video camera for the duration of 35 minutes on the day of the trial (from 09:00 a.m. (0 min) until after blood sampling at 09:35 a.m. (35 min)). The different parameters were assessed as frequency (n) in 35 minutes.

Behavioral Parameter	**Description of Parameter**	**n/ 35 min**
Ear Movements	Movement of both ears or of one individual ear; one ear movement was counted as movement to the back and then the front again	
Movement of the head	Headbanging to the side, up or down for no other reason than stress	
Movement of the limbs	Tripping, banging and kicking with the legs as evasive behavior and tightening of the limbs	
Sequence of movements	Movement sequence (from rest to rest) e.g. walking or circling in the igloo, or moving forwards, sideways or backwards while standing	
Tail Movements	Quick movements of the tail from one side to the other (from rest to rest)	
Evasive Behavior	Evasive movements in the crush (either to the front, side, or backwards)	
Vocalization	Groaning, Moaning, Mooing, or other forms of vocalization	
Teeth Grinding	As a reaction to either pain or stress	
Urination		
Defecation		

Appendix D: General findings, findings of clinical examination according to Dirksen et al. (1979), and laboratory findings of selected blood parameters in n = 24 male calves of the German Simmental Breed on D0 of a clinical trial to evaluate the effect of a stressful stimulus on substance P and cortisol concentrations, as well as on the behavior and activity. Calves were randomly assigned to either control (CON) or trial (STRESS) groups. Parameters are presented as mean and standard deviation (SD). Ranges are given in brackets.

	Total	**CON**	**STRESS**
	(n = 24)	(n = 12)	(n = 12)
	General Findings		
Age (d)	40.9 ± 3.2	41.2 ± 2.9	40.6 ± 3.4
	(35 – 46)	(35 – 46)	(35 – 45)
	Findings of Clinical Examination		
Temperature (°C)	38.7 ± 0.3	38.7 ± 0.3	38.7 ± 0.3
	(38.0 – 39.4)	(38.3 – 39.4)	(38.0 – 39.2)
Heart Rate (beats/minute)	117 ± 15	116 ± 17	119 ± 13
	(92 - 152)	(96 – 152)	(92 – 144)
Respiratory Rate (breaths/minute)	40 ± 4	39 ± 4	40 ± 4
	(36 - 48)	(36 – 48)	(36 – 48)
	Findings of Laboratory Analysis		
PCV[1] (30 – 36%)	26.1 ± 8.5	29.0 ± 7.8	23.5 ± 8.3
	(10.66 - 37.18)	(12.24 – 37.16)	(10.66 – 37.18)
Leucocytes[2] (4 – 10 x10³/µl)	6.3 ± 1.7	7.0 ± 2.1	5.7 ± 1.0
	(3.99 – 10.90)	(4.32 – 10.90)	(3.99 – 7.22)
Total Protein (40 – 80 g/L)	53.4 ± 3.1	52.5 ± 2.8	54.3 ± 3.1
	(47.50 – 60.90)	(47.50 – 56.10)	(48.20 – 50.90)
Albumin	33.4 ± 1.7	32.4 ± 1.1	34.3 ± 1.6
	(30.5 – 36.30)	(30.5 – 34.50)	(31.70 – 36.30)
Globulin	20.0 ± 2.5	20.0 ± 2.2	20.0 ± 2.8
	(15.2 – 25.0)	(15.7 – 22.8)	15.2 – 25.0
GSPHX[3] (>250 g/Hb)	990.5 ± 520.8	934.4 ± 554.7	1046.7 ± 478.1
	(27 – 2259)	(27 – 2089)	(331 – 2259)

[1]Packed Cell Volume, values are missing for one calf (11, CON) due to coagulation of EDTA blood [2]Values are missing for two calves (11,13 CON) due to coagulation of EDTA blood. [3]Gluthathione Peroxidase, evaluated on the day of arrival of the calves at the Clinic for Ruminants with Ambulatory and Herd Health Services.

Appendix E: Missing data in n = 24 male calves of the German Simmental Breed to assess plasma substance P concentrations (PSPC), salivary substance P concentrations (SSPC), plasma cortisol concentrations (PCC), glucose concentrations, and behavioral data before, during, and after a stressful stimulation. Animals were assigned to either control (CON) or trial (STRESS) group.

Appendix E.1.: Samples that needed to be analyzed another time for evaluation of plasma substance P concentrations (PSPC).

Group			
CON		**STRESS**	
Animal	**Timepoint**	**Animal**	**Timepoint**
Analysis repeated due to duplicates of optical densities varying more than 15%			
13	2 hours		
21	2 hours		
Dilution 1:20 due to PSPC exceeding 10,000 pg/ml			
		15	45 min

Appendix E.2.: Samples that needed to be analyzed another time or values below the sensitivity of the ELISA kit for evaluation of salivary substance P concentrations (SSPC).

Group			
CON		**STRESS**	
Animal	**Timepoint**	**Animal**	**Timepoint**
Analysis repeated due to duplicates of optical densities varying more than 15%			
9	60 min before, 0 min	8	1.5 hours, 2 hours
11	0 min	22	15 min, 20 min
12	30 min		
13	45 min		
21	60 min before, 0 min		
SSPC below the sensitivity of the ELISA-Kit			
4	2 hours	7	20 min
5	60 min before, 0 min, 15 min	8	5 min, 30 min
12	15 min, 1 hour	14	5 min, 20 min, 30 min, 45 min
13	60 min before, 0 min, 20 min	15	60 min before, 0 min, 10 min, 15 min
26	all 13 samples	16	all 13 samples
		17	25 min, 30 min
		18	0 min to 2 hours
		19	all 13 samples
		20	0 min and 5 min to 30 min
		25	all 13 samples
		27	60 min before to 35 min and 1 hour to 2 hours

Appendix E.3.: Samples that needed to be analyzed another time for evaluation of plasma cortisol concentrations (PCC).

Group			
CON		**STRESS**	
Animal	**Timepoint**	**Animal**	**Timepoint**
Analysis repeated due to duplicates of optical densities varying more than 15%			
4	15 min, 45 min, 1 hour		
6	1 hour, 2 hours		
10	2 hours		
13	15 min, 20 min, 30 min		
Dilution 1:20 due to PSPC exceeding 10,000 pg/ml			
10	1.5 hours	7	0 min to 25 min and 45 min, 1.5 hours
11	15 min to 25 min and 1 hour, 2 hours	18	60 min before, 5 min, 25 min, 1.5 hours
12	60 min before, 0 min to 25 min and 35 min to 2 hours	19	0 min
13	1.5 hours	22	0 min to 2 hours
23	all 13 samples	25	all 13 samples

Appendix E.4.: Missing data for respiratory rate due to animals sniffling and investigators not being able to count a respiratory rate.

Group			
CON		**STRESS**	
Animal	**Timepoint**	**Animal**	**Timepoint**
5	1 hour	7	15 min
10	25 min	8	45 min
12	15 min, 30 min	14	35 min
13	20 min	16	45 min
21	25 min, 45 min	17	35 min
23	5 min	18	2 hours
24	20 min	19	45 min
		25	1 hour
		26	1 hour

Appendix E.5.: Missing data for activity due to technical problems with the pedometer.

Group	
CON	**STRESS**
Animal	**Animal**
4	7
6	14
11	17
21	19
	20

Appendix F: Mean values and lower and upper confidence intervals (**CI**) of PSPC and SSPC in n = 24 calves of the German Simmental Breed, which were either submitted to a sham (CON, n = 12) or an stressful (STRESS, n = 12) stimulus. Significances (**p**) within groups are indicated, compared with baseline at +00:00 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Significant differences between groups are indicated.

	PSPC (pg/ml)			***SSPC (pg/ml)***		
Time Point	**CON**	**STRESS**	**p**	**CON**	**STRESS**	**p**
+00:00	828.8	757.5	0.6281	38.1	22.4	0.1621
	(639.1-1,074.9)	(584.1-982.4)		(22.6-64.7)	(13.2-38.1)	
+01:00	862.6	665.1	0.1740	32.5	13.5	**0.0211**
	(665.1-1,118.8)	(512.9-862.6)		(19.1-55.1)	(7.9-22.9)	
+01:05	871.3	632.7*	0.0815	41.3	13.1	**0.0027**
	(678.6-1,130.0)	(487.8-820.6)		(24.3-69.4)	(7.7-22.2)	
+01:10	897.8	671.8	0.1314	39.3	13.3	**0.0047**
	(692.3-1,152.9)	(518.0-871.3)		(23.1-66.7)	(7.9-22.6)	
+01:15	828.8	678.6	0.2847	27.7	16.9	0.1927
	(639.1-1,064.2)	(523.2-871.3)		(16.3-47.0)	(10.0-28.5)	
+01:20	804.3	632.7*	0.1995	40.4	13.5	**0.0041**
	(620.2-1043.1)	(487.8-820.6)		(24.0-68.7)	(7.8-23.1)	
+01:25	854.1	665.1	0.1836	29.4	14.6	0.0666
	(658.5-1,107.7)	(512.9-862.6)		(17.3-49.9)	(8.6-24.8)	

Continuing Appendix F:

	PSPC (pg/ml)			*SSPC (pg/ml)*		
Time Point	**CON**	**STRESS**	**p**	**CON**	**STRESS**	**p**
+01:30	788.4	685.4	0.4544	40.4	11.8*	**0.0012**
	(607.9-1,012.3)	(528.5-880.1)		(23.8-68.7)	(7.0-20.1)	
+01:35	788.4	845.6	0.6992	30.3	14.9	0.0618
	(607.9-1,022.5)	(652.0-2,951.3)		(17.8-51.4)	(8.8-25.0)	
+01:45	788.4	765.1	0.8410	29.1	14.2	0.0592
	(607.9-1,022.5)	(589.9-982.4)		(17.1-49.4)	(8.4-24.0)	
+02:00	757.5	685.4	0.5934	41.7	23.6	0.1306
	(584.1-982.4)	(528.5-888.9)		(24.5-70.8)	(13.9-39.6)	
+02:30	788.4	658.5	0.3521	30.6	26.3	0.6683
	(607.9-1,022.5)	(507.8-854.1)		(18.4-52.5)	(15.5-44.7)	
+03:00	772.8	735.1	0.8150	41.3	17.8	**0.0276**
	(595.9-1,002.2)	(566.8-953.4)		(24.5-70.1)	(10.6-30.3)	

Appendix G: Significant differences (**p**) of PSPC, SSPC, and PCC between time points within two different groups of calves, which either remained in the igloo (CON, n = 12), or were exposed to a stressful (STRESS, n = 12) stimulus (from 0 min to 30 min).

Abbreviations: 60 min before = -60 min; minute = min; hour(s) = h.

PSPC (pg/ml)						SSPC (pg/ml)						PCC (pg/ml)					
CON			STRESS			CON		STRESS				CON			STRESS		
Timepoint		P	Timepoint		P	Timepoint	P	Timepoint		P		Timepoint		P	Timepoint		P
5 min	1 h	0.0980	0 min	35 min	0.0064			0 min	1 h	0.0489		0 min	2 h	0.0916	0 min	2 h	0.0858
10 min	1 h	0.0582	5 min	35 min	0.0008			0 min	1.5 h	0.0175		5 min	25 min	0.0563	5 min	1.5 h	0.0800
10 min	2 h	0.0875	5 min	45 min	0.0308			5 min	1 h	0.0383		10 min	30 min	0.0103	5 min	2 h	0.0184
			5 min	2 h	0.0728			5 min	1.5 h	0.0132		10 min	35 min	0.0361	20 min	1.5 h	0.0455
			10 min	35 min	0.0091			10 min	1 h	0.0460		10 min	1 h	0.0170	20 min	2 h	0.0092
			15 min	35 min	0.0098			10 min	1.5 h	0.0163		10 min	1.5 h	0.0190	25 min	2 h	0.0609
			20 min	35 min	0.0008			20 min	1 h	0.0519		10 min	2 h	0.0030	35 min	2 h	0.0200
			20 min	45 min	0.0320			20 min	1.5 h	0.0192		15 min	30 min	0.0866	45 min	2 h	0.0249
			20 min	2 h	0.0754			25 min	1 h	0.0920		15 min	2 h	0.0348			
			25 min	35 min	0.0060			25 min	1.5 h	0.0364		20 min	30 min	0.0286			
			30 min	35 min	0.0136			30 min	1 h	0.0146		20 min	35 min	0.0858			
			35 min	1 h	0.0167			30 min	1.5 h	0.0044		20 min	1 hour	0.0446			
			35 min	1.5 h	0.0045			35 min	1.5 h	0.0413		20 min	1.5 h	0.0491			
								45 min	1 h	0.0745		20 min	2 h	0.0097			

Continuing Appendix G:

PCC (pg/ml)				
CON			STRESS	
Timepoint		P	Timepoint	P
25 min	30 min	0.0046		
25 min	35 min	0.0181		
25 min	1 h	0.0080		
25 min	1.5 h	0.0090		
25 min	2 h	0.0012		
45 min	2 h	0.0481		

Appendix H: Mean values and lower and upper confidence intervals (**CI**) of cortisol and glucose in = 24 calves of the German Simmental Breed, which were either submitted to a sham (CON, n = 12) or a stressful (STRESS, n = 12) stimulus. Significances (**p**) within groups are indicated, compared with baseline at +00:00 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Significant differences between groups are indicated.

	Cortisol (pg/ml)			***Glucose (mmol/lt)***		
Time Point	**CON**	**STRESS**	**p**	**CON**	**STRESS**	**p**
+00:00	2,059.1 (1,032.8-4,105.2)	2,038.6 (1,022.5-4,064.3)	0.9815	6.03 (5.57-6.48)	6.03 (5.57-6.48)	1.0000
+01:00	1,772.2 (880.1-3,568.9)	2,643.9 (1,326.1-5,324.1)	0.4184	6.51* (6.05-6.96)	5.91 (5.45-6.36)	0.0671
+01:05	1,844.6 (916.0-3,714.5)	3,102.6 (1,556.2-6,185.7)	0.2988	6.42* (5.96-6.87)	5.74 (5.29-6.20)	**0.0403**
+01:10	1,236.5* (620.2-2,465.1)	2,344.9 (1,176.1-4,722.1)	0.1969	6.33 (5.87-6.78)	5.67 (5.22-6.13)	**0.0480**
+01:15	1,525.4 (757.5-3,041.2)	2,565.7 (1,286.9-5,115.3)	0.2953	6.24 (5.79-6.70)	5.72 (5.26-6.17)	0.1077
+01:20	1,366.5 (678.6-2,724.4)	3,294.5* (1,652.4-6,568.2)	0.0772	6.16 (5.70-6.61)	5.62* (5.17-6.08)	0.1023
+01:25	1,164.4* (578.2-2,321.6)	2,751.8 (1,380.2-5,486.2)	0.0824	6.04 (5.59-6.50)	5.64* (5.19-6.10)	0.2177

Continuing Appendix. H:

	Cortisol (pg/ml)			*Glucose (mmol/lt)*		
Time Point	**CON**	**STRESS**	**p**	**CON**	**STRESS**	**p**
+01:30	2,298.5 (1,152.9-4,582.5)	2,835.6 (1,422.3-5,653.3)	0.6701	6.03 (5.57-6.48)	5.66 (5.20-6.11)	0.2579
+01:35	2,038.6 (1,022.5-4,105.2)	3,071.7 (1,540.7-6,124.2)	0.4162	5.96 (5.50-6.41)	5.78 (5.32-6.23)	0.5696
+01:45	1,571.8 (788.4-3,133.8)	3,010.9 (1,510.2-6,002.9)	0.1907	5.98 (5.53-6.44)	5.92 (5.47-6.38)	0.8562
+02:00	2,186.4 (1,096.6-4,402.8)	2,440.6 (1,212.0-4,865.9)	0.8403	6.01 (5.55-6.46)	5.82 (5.36-6.27)	0.5523
+02:30	2,164.6 (1,085.7-4,359.0)	2,038.6 (1,022.5-4,064.3)	0.8925	5.80 (5.34-6.26)	5.57* (5.11-6.02)	0.4697
+03:00	2,540.2 (1,274.1-5,064.4)	1,754.6 (880.1-3,498.2)	0.4631	5.96 (5.50-6.41)	5.47** (5.02-5.93)	0.1378

Appendix I: Significant differences (**p**) of glucose concentrations, heart rate, and breathing rate between time points within two different groups of calves, which either remained in the igloo (CON, n = 12), or were exposed to a stressful (STRESS, n = 12) stimulus (from 0 min to 30 min).

Glucose (mmol/lt)						Heart Rate (beats/minute)						Breathing Rate (breaths/minute)					
CON			STRESS			CON			STRESS			CON			STRESS		
Timepoint		P	Timepoint		P	Timepoint		P	Timepoint		P	Timepoint		P	Timepoint		P
0 min	20 min	0.0673	0 min	1.5 h	0.0740	0 min	1 h	0.0285	0 min	45 min	0.0002	0 min	1 h	0.0980	45 min	1 h	0.0405
0 min	25 min	0.0150	0 min	2 h	0.0237	0 min	2 h	0.0160	0 min	1.5 h	0.0003	0 min	2 h	0.0214	2 h	25 min	0.0534
0 min	30 min	0.0118	45 min	1.5 h	0.0611	5 min	1 h	0.0250	0 min	2 h	0.0007	5 min	20 min	0.0013	2 h	30 min	0.0490
0 min	35 min	0.0042	45 min	2 h	0.0189	5 min	2 h	0.0139	5 min	45 min	0.0002	5 min	25 min	0.0270	2 h	45 min	0.0109
0 min	45 min	0.0063	1 h	2 h	0.0740	15 min	1 h	0.0102	5 min	1.5 h	0.0004	5 min	2 h	0.0254			
0 min	1 h	0.0092				20 min	1 h	0.0118	5 min	2 h	0.0008	10 min	1 h	0.0198			
0 min	1.5 h	0.0002				30 min	1 h	0.0100	10 min	45 min	0.0189	15 min	1 h	0.0853			
0 min	2 h	0.0042				2 h	10 min	0.0871	10 min	1 h	0.0188	20 min	30 min	0.0900			
5 min	25 min	0.0501				2 h	15 min	0.0053	15 min	45 min	0.0003	20 min	35 min	0.0634			
5 min	30 min	0.0408				2 h	20 min	0.0062	20 min	45 min	0.0289	20 min	1 h	0.0104			
5 min	35 min	0.0168				2 h	25 min	0.0632	20 min	1 h	0.0120	1.5 h	2 h	0.0414			
5 min	45 min	0.0237				2 h	30 min	0.0052	25 min	45 min	0.0005	2 h	10 min	0.0026			

Continuing Appendix I:

Glucose (mmol/lt)					Heart Rate (beats/minute)						Breathing Rate (breaths/minute)				
CON			STRESS		CON			STRESS			CON			STRESS	
Timepoint		P	Timepoint	P	Timepoint		P	Timepoint		P	Timepoint		P	Timepoint	P
5 min	1 h	0.0330			2 h	35 min	0.0904	30 min	45 min	0.0022	2 h	15 min	0.0186		
5 min	1.5 h	0.0014						35 min	45 min	0.0134	2 h	45 min	0.0539		
5 min	2 h	0.0168						35 min	1 h	0.0261					
10 min	35 min	0.0553						45 min	1 h	<.0001					
10 min	45 min	0.0740						1.5 h	10 min	<.0001					
10 min	1 h	0.0977						1.5 h	15 min	0.0003					
10 min	1.5 h	0.0063						1.5 h	20 min	<.0001					
10 min	2 h	0.0553						1.5 h	25 min	0.0001					
15 min	1.5 h	0.0212						1.5 h	30 min	<.0001					
20 min	1.5 h	0.0611						1.5 h	35 min	<.0001					
								1.5 h	45 min	<.0001					
								1.5 h	1 hour	0.0103					
								2 h	10 min	<.0001					
								2 h	15 min	0.0007					
								2 h	20 min	<.0001					

Continuing Appendix I:

Heart Rate (beats/minute)				
CON		**STRESS**		
Timepoint	**P**	**Timepoint**		**P**
		2 h	25 min	0.0004
		2 h	30 min	0.0001
		2 h	35 min	<.0001
		2 h	45 min	<.0001
		2 h	1 h	0.0194

IV. DISKUSSION

1.1. Versuchstiere

Die Kälber dieser Studie wurden entweder auf einem bayerischen Kälbermarkt ersteigert oder vom Lehr- und Forschungszentrum Achselschwang (zu den Bayerischen Staatsgütern gehörend) erworben (Kälber 4 und 5). Kälber, die für die vorliegende Studie gekauft wurden, sollten sowohl „genetisch hornlos“ als auch „unkastriert“ sein, um frühere Schmerz- oder Stresssituationen der Kälber weitestgehend zu vermeiden. Die Kälber, die in diese Studie miteinbezogen wurden, waren 4 - 6 Wochen alt – dies sollte den Einfluss von Entzündungsprozessen so weit wie möglich begrenzen und das einfache Handling mit den Kälbern noch möglich machen. Kälber im Alter von 28 Tagen sind deutlich robuster als solche, die im Alter von etwa 14 Tagen transportiert werden (MARCATO et al., 2022b), was auf eine fortgeschrittenere Entwicklung ihrer adaptiven Immunität zurückzuführen ist (MARCATO et al., 2022a). Eine Studie von HASAN et al. (2017) zeigte jedoch, dass Kälber unter 6 Monaten ein signifikant höheres Risiko haben an Krankheiten zu leiden, weswegen das Kälberalter in unserer Studie eine Einschränkung darstellt. In unserer Studienpopulation wurden Durchfall und Atemwegserkrankungen als die am häufigsten auftretenden Krankheiten beobachtet, was im Einklang mit Ergebnissen von SVENSSON et al. (2003); SVENSSON and LIBERG (2006); JOHNSON et al. (2021) steht. Dennoch wurde diese Altersgruppe der vorliegende Studie bewusst gewählt, da die meisten zootechnischen Eingriffe wie (chirurgische) Kastration und Enthornung normalerweise in dieser Altersgruppe durchgeführt werden und zu Schmerzen und Stress führen (STAFFORD & MELLOR, 2005). Diese Tatsache macht grundlegende Forschungsarbeiten über Schmerzparameter in dieser Altersgruppe erforderlich.

Obwohl alle Kälber vor dem Kauf auf dem Markt klinisch untersucht wurden, gab es keine Informationen über andere Risikofaktoren für Krankheiten, wie z. B. Kolostrumaufnahme, Hygiene, Temperatur und Zugluft im Herkunftsstall, Gruppierung und Unterbringung der Tiere, Management (LUNDBORG et al., 2005; JOHNSON et al., 2021) und andere mögliche Einflüsse. Weitere Risikofaktoren für Krankheiten, die in unserer Studienpopulation nicht

ausgeschlossen werden konnten, waren der Verkauf über den Kälbermarkt und der damit verbundene Infektionsdruck (DUBÉ et al., 2010), sowie der Transport (CREUTZINGER et al., 2021). Während der Eingewöhnungsphase in der Klinik wurden die Tiere zunächst keiner Behandlung unterzogen. Akuter Durchfall an den Versuchstagen der ersten drei Kälber hatte jedoch die Einführung eines standardisierten prophylaktischen Behandlungsprotokolls zur Folge. Um den Einfluss von Krankheiten auf unsere Versuchs- und Studienergebnisse zu begrenzen, wurden am Tag 0 des Versuchs Blutproben zur Bestimmung unter anderem der Leukozytenzahl entnommen, die nachweislich signifikant und positiv mit PSPC korreliert (LANDINGER et al., 2024). Tiere mit einer deutlichen Überschreitung des Referenzbereichs wären von der Studie ausgeschlossen worden. Ein weiteres Ausschlusskriterium war die Behandlung mit einem Antibiotikum oder NSAID innerhalb von 48 Stunden vor der Studie, da die Behandlung mit Analgetika wie Metamizol (TSCHONER et al., 2018) oder Meloxicam (COETZEE et al., 2012b; ALLEN et al., 2013) die PSPC im Blut beeinflusst.

1.2. Stressreiz

In unserer Studie bestand der Stressreiz aus dem Führen des Kalbes zum Versuchsraum, der Fixierung im Zwangsstand, dem Ausscheren der Herzgegend, der ultrasonographischen Untersuchung des Herzens und dem Führen des Kalbes zurück in das Iglu. Nach PESENHOFER et al. (2006) führt die stehende Fixierung im Zwangsstand bei erwachsenen Rindern zu einem Anstieg der Cortisolkonzentration. Das Hin- und Zurückführen, die Fixierung im Zwangsstand, das Ausscheren und vor allem die ultrasonographische Untersuchung können als erweiterter Stressreiz angesehen werden, da die Kälber dies noch nie zuvor erlebt hatten. Dies steht im Gegensatz zu den Tieren in einer zusammenhängenden Studie (TSCHONER et al., unpublished), in der die Kälber vor dem Versuch sieben Tage lang daran gewöhnt und trainiert wurden in einem Zwangsstand zu stehen, um den Stress am Versuchstag zu minimieren. Damit der Stressreiz der vorliegenden Studie während des Versuchs konstant verläuft, wurde die ultrasonographische Untersuchung immer von denselben zwei Personen durchgeführt. Zusätzlich wurde auf eine gleichbleibende Anzahl an Personen im Raum geachtet. Ursprünglich war ein Versuchsaufbau ähnlich dem einer Studie von AMBERGER (2009) geplant, bei

welcher die Kälber für die ultrasonographische Untersuchung in Seitenlage gebracht wurden, was erheblichen Stress und einen Anstieg des Cortisolspiegels verursacht (TAGAWA et al., 1994; RIZK et al., 2012b). Für die vorliegende Studie war die ursprüngliche Planung nicht möglich, da aufgrund von Änderungen der Transportverordnung keine jungen Kälber mehr gekauft werden konnten. Die deutsche Transportverordnung, die 2023 in Kraft trat, besagt, dass Kälber vor dem Transport 28 Tage alt sein müssen (TierSchTrV §10 Abs. 4, 2023). Die Kälber waren mit einem Alter von vier bis sechs Wochen zu schwer, um diese sicher und ohne Sedierung oder zusätzliche Personen in Seitenlage verbringen zu können. Die Verwendung von Xylazin zur Sedierung hätte die Ergebnisse der Studie beeinflusst, da α-2-Agonisten die Freisetzung von Noradrenalin und SP hemmen (ANDERSON & MUIR, 2005). Daher wurde das Studiendesign entsprechen angepasst und die Tiere stehend im Zwangsstand einer ultrasonographischen Untersuchung unterzogen.

1.3. Plasma-Substanz P-Konzentrationen

In der Studienpopulation der vorliegenden Studie zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in den Plasma-Substanz P-Konzentrationen (PSPC, plasma substance P concentrations) zwischen STRESS und CON, mit Ausnahme von „5 min“, wo die PSPC bei den Tieren in CON im Vergleich zu STRESS höher waren. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen von VAN ENGEN et al. (2014); VAN ENGEN et al. (2019), bei deren Studien die SP-Konzentrationen bei Kälbern als Folge von Transportstress, anstiegen. Die Unterschiede zur vorliegenden Studie lassen sich durch die Akklimatisierung unserer Kälber an ihre Umgebung, die klinische Untersuchung, und Umgang mit den Tieren nach dem Transport erklären. In der vorliegenden Studie nahm die PSPC während des Stressereignisses ab, wobei es signifikante Unterschiede zwischen „-60 min“ und „5 min“ und „20 min“ gab, während bei den Tieren in CON keine Unterschiede festgestellt werden konnten. In einer Studie aus der Humanmedizin wurde nach akutem Stress eine erhöhte B-Endorphin-Plasmakonzentration, aber keine Veränderungen von PSPC im Blut festgestellt (SCHEDLOWSKI et al., 1995). GERACIOTI et al. (2006) fanden erhöhte SP-Konzentrationen im zentralen Nervensystem bei menschlichen Patient*innen mit schweren Depressionen und PTBS. Es ist möglich, dass die Untersuchung von Liquor cerebrospinalis in unserer Studie zu anderen Ergebnissen

geführt hätte. Es besteht Grund zur Annahme, dass SP physiologische und verhaltensbezogene Stressreaktionen im Gehirn moduliert. Weiters führt die Exposition gegenüber einer Vielzahl emotionaler, physischer und schmerzhafter Stressoren zu veränderten SP-Gewebespiegeln oder SP-Immunreaktivität in verschiedenen Gehirnregionen (EBNER & SINGEWALD, 2006). Daher könnten Untersuchungen der SP-Konzentrationen in anderen Matrices als Blut und Speichel, oder die Analyse verschiedener Hirnregionen während des Stressreizes, andere Ergebnisse liefern. Nichtsdestotrotz stimmen unsere Ergebnisse in gewisser Weise mit denen von TSCHONER et al. (2020a) überein, die keine Unterschiede in der PSPC-Konzentration zwischen Tieren feststellten, die entweder mit einem Placebo oder mit Xylazinhydrochlorid behandelt wurden, um den Stress vor einer laparoskopischen Fixierung des Labmagens zu reduzieren. Es ist schwierig unsere Ergebnisse mit anderen Studien zu vergleichen, da Stress und Schmerz in den meisten Studien nicht getrennt voneinander gemessen wurden. Zudem wurde in ähnlichen Studien zum Thema Stressbewertung ein NSAID verabreicht (VAN ENGEN et al., 2014; VAN ENGEN et al., 2019). Beim Vergleich der gesamten PSPC in unserer Studienpopulation mit anderen Forschungsarbeiten bei Rindern waren die PSPC in unserer Studie höher als die PSPC bei 14 bis 21 Tage alten Kälbern (LANDINGER et al., 2024). Diese Unterschiede können altersbedingt bedingt sein, da höhere PSPC sowohl bei älteren Kälbern (DOCKWEILER et al., 2013) als auch bei erwachsenen Rindern (LANDINGER et al., 2024) festgestellt wurden.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass akuter Stress die PSPC nicht erhöht, sondern es zu einem Abfall der PSPC kommt. Allerdings war der Stressreiz möglicherweise nicht stark genug, um eine ausgeprägtere Reaktion bei den Tieren hervorzurufen. HWANG et al. (2005) zeigten, dass die Bindung von SP-Rezeptoren in der zentralen Amygdala 24 und 48 Stunden nach der Stresseinwirkung zunimmt, wenn Ratten zwei Stunden lang fixiert werden. Es ist also wahrscheinlich, dass die Dauer der Stressbelastung und die Schwere des Stressors wichtige Faktoren für die beobachteten Auswirkungen auf die SP-Übertragung sind, zumindest in der Amygdala (EBNER & SINGEWALD, 2006). In anderen Studien an Rindern wurden stärkere oder chronische Stressreize verwendet und bewertet. In einer Arbeit von AMBERGER (2009) wurden Kälber für eine Ultraschalluntersuchung in Seitenlage fixiert, was als stärkerer Stressreiz im Vergleich zu einer

ultrasonographischen Untersuchung im Zwangsstand angesehen werden kann. Da AMBERGER (2009) jedoch weder PSPC noch die Plasma-Cortisolkonzentration (PCC, plasma cortisol concentrations) bewertet hat, ist ein direkter Vergleich nicht möglich. In anderen Studien wurden die Kälber entweder 8 (VAN ENGEN et al., 2019) oder sogar 16 Stunden (VAN ENGEN et al., 2014) transportiert, was im Vergleich zur vorliegenden Studie eine längere Stressbelastung darstellt. Da in diesen Studien außerdem nur zwei Blutproben entnommen wurden und keine Kontrollgruppen miteinbezogen wurden (VAN ENGEN et al., 2014; VAN ENGEN et al., 2019), ist ein Vergleich mit unserer Studie nicht möglich.

Auch das Temperament der Tiere kann die PSPC beeinflussen. KASIMANICKAM et al. (2018) fanden signifikant höhere SP-Konzentrationen bei nervösen im Vergleich zu ruhigen Rindern vor dem Absetzen und der Aufzucht. Außerdem wurden in früheren Studien hohe Variationen von PSPC zwischen und innerhalb von Tieren beschrieben (COETZEE et al., 2008; LANDINGER et al., 2023). Diese Ergebnisse könnten die Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren in der vorliegenden Arbeit erklären.

1.4. Korrelation zwischen Plasma-Substanz P-Konzentrationen und Plasma-Cortisolkonzentrationen

In unserer Studie wurde eine positive und signifikante Korrelation zwischen PSPC und PCC festgestellt, die bereits für Neugeborene beschrieben wurde (DIONYSAKOPOULOU et al., 2023). Bei Männern wurde ein Trend zur Signifikanz zwischen der Fläche unter der Kurve für SP und Cortisol gefunden (ROHLEDER et al., 2006). Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Studie von KASIMANICKAM et al. (2019), eine aktuelle Studie von TSCHONER et al. (unpublished), stellte hingegen eine signifikante und negative Korrelation zwischen PSPC und PCC bei Kälbern nach wiederholter schmerzhafter Stimulation fest.

1.5. Speichel-Substanz P-Konzentrationen

Die Verwendung von Speichel als Biomarker hat viele Vorteile, insbesondere hinsichtlich der Probenentnahme (CERÓN et al., 2022), die im Vergleich zur Blutentnahme weniger invasiv ist (GRÖSCHL, 2008; PFAFFE et al., 2011). Darüber hinaus eignet sich Speichel sehr gut zu Zwecken des Monitorings und

bietet viele potenzielle Anwendungsmöglichkeiten, sowohl in der Veterinärmedizin als auch im Humanbereich (GRÖSCHL, 2008; PFAFFE et al., 2011; LAMY & MAU, 2012). In der Humanmedizin fanden JASIM et al. (2018) signifikante Unterschiede zwischen SP-Konzentrationen im Blut und im Speichel. Basierend auf den analysierbaren Proben konnte bei der vorliegenden Studie keine Korrelation zwischen der Speichel-Substanz P-Konzentration (SSPC = saliva substance P concentrations) und PSPC festgestellt werden. Unseres Wissens nach ist eine Studie von MAYER (2019) bisher die einzige Arbeit, welche die SSPC bei Kälbern bewertet. Trotz der nahezu identischen Probenentnahme und -verarbeitung ist ein Vergleich dennoch schwierig, da in der Studie von MAYER (2019) nur 2 Speichelproben entnommen wurden (D-1 und D0) und eine geringere Anzahl von Versuchstieren (16 Kälber) verwendet wurde.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie müssen jedoch mit Vorsicht betrachtet werden, da die SSPC bei 16 Tieren und 106 von 312 Proben (34%) unterhalb der Empfindlichkeit des ELISA-Kits lagen. Die SSPC Proben wurden analog zur Studie von MAYER (2019) analysiert, bei welcher alle Proben analysierbar waren. Ein möglicher Einflussfaktor auf die SSPC stellt die Verarbeitung der Proben dar. Zur Stabilisierung von SP wurde Aprotinin, ein natürliches basisches Polypeptid und ein Proteaseinhibitor, verwendet. Allerdings konnte das Aprotinin der Salivette nicht vor der Probenentnahme zugefügt werden und die Menge an Aprotinin musste an die Menge des gesammelten Speichels angepasst werden. Der schnelle Transport der Proben ins Labor und die Zugabe von Aprotinin hatten zwar Priorität, aber auch menschliche Faktoren dürfen nicht außer Acht gelassen werden und könnten zu Zeitunterschieden geführt haben. In Hinblick auf unsere Studie ist eine unzureichende SP-Ausscheidung im Speichel denkbar. Bei CON gab es eine höhere Anzahl analysierbarer Ergebnisse, was auf eine verringerte Speichelausscheidung bei den gestressten Tieren schließen lässt. Aus humanmedizinischen Studien geht hervor, dass Stress (GHOLAMI et al., 2017; FREDERIKSEN et al., 2024), Angstzustände und Depressionen (GHOLAMI et al., 2017) die Speichelflussrate beeinflussen und zu Xerostomie führen können. Weiters ist ein unterschiedliches Kauverhalten der Kälber möglich. Auch wenn die verwendete Messmethode – mittels Salivette (vorgesehen zum Gebrauch in der Humanmedizin) – zuvor bereits bei MAYER (2019) beschrieben wurde, könnte diese eine weitere Einschränkung darstellen. Ein saugfähigeres Material, wie z. B. ein Schwamm, den CONTRERAS-

AGUILAR et al. (2019) in ihrer Studie an Schafen verwendeten, hätte unsere Ergebnisse positiv beeinflussen können.

1.6. Plasma-Cortisolkonzentrationen

Cortisol gilt seit langem als wichtigster Indikator für (schmerzbedingten) Stress (BRISTOW & HOLMES, 2007), wird aber auch in der Humanmedizin als Schlüsselindikator für psychischen Stress (TSIGOS & CHROUSOS, 2002) und Depression (MONROE, 2008; SCHMIDT et al., 2011) angesehen. Bei Wiederkäuern werden unmittelbare Veränderungen der Cortisolkonzentrationen hauptsächlich durch akuten schmerzbedingten Stress, aber auch durch Handhabung (LESTER et al., 1991; MOLONY & KENT, 1997), menschliche Anwesenheit und Einschränkung (KARLEN et al., 2021), sowie durch unterschiedliche äußere Bedingungen und Managementtechniken (OGINO et al., 2014) und individuelles und angstbedingtes Verhalten (BRISTOW & HOLMES, 2007) verursacht. Die gleichzeitige Messung der Plasmakonzentrationen von SP und Cortisol hat sich als nützlich für die Unterscheidung von Stress und Schmerz erwiesen (COETZEE et al., 2008; KARLEN et al., 2021). In der vorliegenden Studie gab es keine signifikanten Unterschiede in den PCC zwischen den beiden Gruppen, was darauf hindeutet, dass der stresshafte Stimulus entweder nicht stark genug war, um die Kälber zu stressen, oder dass die Kälber in CON ein ähnliches Ausmaß an Stress erfuhren wie die Kälber in STRESS. Innerhalb der Gruppe CON waren die PCC bei „10 min“ und “25 min“ im Vergleich zu „-60 min“ signifikant niedriger. Eine Studie von STILWELL et al. (2008) ergab, dass der Cortisolspiegel bis zu einer Minute nicht beeinflusst wird, wenn die Blutproben unmittelbar nach der Ruhigstellung der Kälber durch sanfte Fixierung entnommen werden. Da die Bewegungsfreiheit bei den Kälbern der CON-Gruppe manchmal auf ähnliche Weise eingeschränkt werden mussten, um Verletzungen oder die Haltbarkeit des Jugularvenenkatheters während der Probenahme zu vermeiden, könnte die Fixierung der Kälber unsere Ergebnisse beeinflusst haben. Andererseits könnten die niedrigeren PCC auch auf die Gewöhnung an die regelmäßige Probenahme und die menschliche Anwesenheit zurückzuführen sein. Laut STILWELL et al. (2010) ist der Anstieg der PCC bei Kälbern immer vom Stressor abhängig. Bei den Tieren der Gruppe STRESS wurde versucht, den Stressreiz konstant zu halten, während bei den Kälbern der Gruppe CON das Ziel darin bestand, die Kälber so gut wie

möglich vor möglichen externen Stressoren zu schützen. Da der Versuch jedoch an routinemäßigen klinischen Arbeitstagen stattfand, stellen verschiedene Stressoren wie vorbeifahrendes Personal oder Fahrzeuge (CON) und Laborpersonal, welches die Proben für die Verarbeitung der Speichelproben abholte (CON und STRESS) eine Einschränkung der Studie dar. Da die Unterbringung, die Fütterungszeiten, die täglichen allgemeinen Untersuchungen, und die Anzahl der während des Versuchs anwesenden Personen konstant blieben, dürfte der Einfluss dieser Faktoren auf unsere Studienergebnisse gering sein.

1.7. Glukosekonzentrationen im Blut

Die „Kampf- oder Fluchtreaktion“ gilt als ein wichtiger Mechanismus, mit dem ein Organismus auf Stress oder Gefahr reagiert (CANNON, 1915), wobei die Glukosekonzentration im Verlauf der Fluchtreaktion ansteigt (MUDRON et al., 2005). In der vorliegenden Studie könnte die beschriebene Fluchtreaktion und der damit verbundene Anstieg der Glukosekonzentration eine Folge der wiederholten Untersuchungen sowie der eng getakteten Probennahmen gewesen sein. Es fällt auf, dass die Glukosekonzentrationen bei STRESS im Vergleich zu CON zu Beginn der Studie („5 min“ und „10 min“) signifikant niedriger ausfielen. Die Glukosekonzentrationen sollten jedoch bei der Beurteilung der Stressintensität mit Vorsicht betrachtet werden, da sie leicht durch verschiedene andere Faktoren beeinflusst werden können (SCHOLZ, 1990). Ein Beispiel bietet hier die Milchaufnahme, welche sich auf die postprandiale Glukosekinetik (GERRITS, 2019) und damit auf die postprandiale Plasmaglukose bei Milchkälbern auswirkt (GHAFFARI et al., 2017). Der Aspekt der Fütterung sollte in dieser Studie ebenfalls berücksichtigt werden. Variationen in der Kraftfutteraufnahme könnten ein Grund für die unterschiedlichen Glukosespiegel sowohl zwischen als auch innerhalb der Gruppen sein, da Kraftfutter ad libitum zur Verfügung stand (der Zeitraum der ultrasonographischen Untersuchung in der Gruppe STRESS ausgenommen). Die unterschiedlichen Glukosekonzentrationen könnten auch mit den Fütterungszeiten zusammenhängen. Ein genaues Einhalten des angesetzten Fütterungszeit um 07:00 war im klinischen Alltag nicht immer möglich. Auch die endogene Glukoseproduktion durch Glukoneogenese in der Leber (HAMMON et al., 2003) und das Alter der Kälber (OMIDI-MIRZAEI et al., 2015) können die Glukosekonzentration beeinflussen. Außerdem sollte, obwohl die Versuche am

Morgen durchgeführt wurden, der Hitzestress berücksichtigt werden. Verschiedene Studien, die zur Auswirkung von Hitzestress auf den Glukosespiegel durchgeführt wurden, zeigten einen signifikanten Rückgang des Glucosespiegels bei Milchkühen (RHOADS et al., 2009; WHEELOCK et al., 2010; BAUMGARD et al., 2011). Da die Versuche der vorliegenden Studie jedoch über einen Zeitraum von mehr als einem Jahr durchgeführt wurden, sollte der Hitzestress als Einfluss auf unsere Studienergebnisse eine untergeordnete Rolle spielen.

1.8. Verhalten am Tag des Versuchs

Die Veränderungen des Tierverhaltens werden als wichtiger Faktor im Versuchsaufbau anerkannt (ARAVE & ALBRIGHT, 1981) und die Verhaltensbewertung kann ein leistungsfähiges Instrument zur Feststellung von Veränderungen im Tierverhalten sein (JOHNSON et al., 2008). Die Bewertung der Verhaltensparameter umfasste die Messung der bovinen Grimace Scale (GLEERUP, 2017) modifiziert nach FEIST et al. (2008); TSCHONER et al. (2020a), der Körperhaltung sowie physiologischer Parameter wie Herzfrequenz (HF) und Atemfrequenz (AF). Die HF bzw. die Herzfrequenzvariation (HRV, heart rate variability) wird zur Messung der Reaktionen des autonomen Nervensystems auf chronischen oder akuten Stress (HAGEN et al., 2005; KOVÁCS et al., 2015a), sowie auf externen und internen Stress verwendet, der zu einem signifikanten Anstieg der HF in Kälbern führen kann (MOHR et al., 2002).

In der vorliegenden Studie war die HF der Kälber in STRESS im Vergleich zu den Tieren in CON zu fast allen Zeitpunkten entweder signifikant oder tendenziell höher. Dieses Ergebnis könnte das gesteigerte Stressniveau der Tiere in STRESS widerspiegeln. Allerdings muss auch die Menge an Bewegung berücksichtigt werden, sowohl bei den Tieren der Gruppe STRESS (Hin- und Rückweg zum Zwangsstand) als auch bei CON (freie Bewegung im Iglu), da die Bewegung ein Schlüsselfaktor ist, der die HRV beeinflusst (OISHI et al., 2018). Bei den Kälbern der Gruppe CON könnte der Rückgang der HF mit einer Gewöhnung an die menschliche Anwesenheit und die Probennahme zusammenhängen. Die HF kann sich auch aufgrund des individuellen Temperaments und der Reaktivität auf Menschen ändern (KOVÁCS et al., 2015b), was unsere Ergebnisse beeinflusst haben könnte.

Ein Anstieg der AF ist ein wichtiger Indikator für Stress (GAUGHAN et al., 2000) und ein indirektes Instrument zur Bewertung von Schmerzen (SAEED et al., 2008; GIGLIUTO et al., 2014). Die AF als Parameter wird jedoch hauptsächlich bei hitzegestressten Tieren verwendet (HAHN et al., 1997; POLSKY & VON KEYSERLINGK, 2017). Auch der Temperatur-Feuchtigkeits-Index (THOM, 1959), die Körperhaltung eines Tieres (PINTO et al., 2019) und Krankheiten der Atemwege (GAETA et al., 2018) können einen Einfluss auf die AF haben. In der vorliegenden Studie war die AF bei den Tieren der Gruppe STRESS im Vergleich zu CON bei „45 min“ tendenziell signifikant höher, was mit dem Transport der Tiere vom Zwangsstand zum Iglu zusammenhängen kann. Bei den STRESS Kälbern lag die AF über dem Basalwert, insbesondere während der Fixierung im Zwangsstand und der ultrasonographischen Untersuchung. Dies deutet auf tatsächlich ausgelösten Stress hin. Die Häufigkeit der anderen bewerteten Verhaltensparameter zwischen den Gruppen zeigte nur bei der „Kopfhaltung“ signifikante Unterschiede, wobei die Kälber der STRESS-Gruppe im Vergleich zu den Tieren der CON-Gruppe signifikant häufiger „gleiche Höhe wie die Dorsallinie“ zeigten. Die Nackenhaltung bei Rindern wurde bisher nur wenig untersucht (DE OLIVEIRA & KEELING, 2018), aber GLEERUP (2017) stellte fest, dass Schmerzen häufig zu einer niedrigeren Kopfhaltung führen. In unserer Studie könnten diese Haltung und die horizontale Position des Kopfes auf die Bewegungseinschränkung durch den Zwangsstand zurückzuführen sein.

1.9. Verhaltensbeurteilung während des Stressreizes

In der vorliegenden Studie wurde ein nach RIZK et al. (2012a) modifiziertes Ethogramm zur Bewertung des Verhaltens während des Stressreizes in STRESS, und während des gleichen Zeitraums in CON verwendet. Während in einer zusammenhängenden Studie von TSCHONER et al. (unpublished) die Verhaltensbeobachtung im Zuge eines Schmerzreizes angewandt wurde und die Parameter laut RIZK et al. (2012a) übernommen wurden, erfolgten in der vorliegenden Studie geringgradige Abänderungen einzelner Parameter. STRESS-Kälber zeigten eine signifikant höhere Häufigkeit von „Ohrbewegungen“ im Vergleich zu CON-Kälbern. Nach PROCTOR and CARDER (2014) ist die entspannte Position der Ohren ein Indikator für einen positiven emotionalen Zustand bei Kühen. REEFMANN et al. (2009) fanden eine reduzierte Anzahl von

Ohrpositionsänderungen während positiver und eine erhöhte Anzahl während negativer Erfahrungen bei Schafen. Für die STRESS-Gruppe unserer Studie lässt dies auf ein höheres Maß an erlebten negativen Erfahrungen schließen. „Bewegung der Gliedmaßen“ wurde bei den Kälbern der Gruppe STRESS signifikant häufiger festgestellt als bei den Tieren der Gruppe CON, was im Einklang mit GRANDIN (1993) steht, die eine erhöhte Bewegung bei Rindern, als Zeichen von Unruhe feststellen konnten. Andere Faktoren, welche die Bewegung beeinflussen, wie z. B. soziale Isolation (BOISSY & LE NEINDRE, 1997) und die Unterbringung der Kühe in einer neuen Umgebung (HOPSTER, 1998), könnten auch auf die Ergebnisse unserer Studie zutreffen. Nach RUSHEN et al. (1999c) erhöht die soziale Isolation in einer ungewohnten Umgebung die Häufigkeit von Defäkation, Urinieren und/oder Lautäußerungen. In der vorliegenden Studie setzen die Kälber der STRESS-Gruppe signifikant öfter Harn ab (stehend, im Zwangsstand), als es bei Kälbern der CON-Gruppe der Fall war. Die Videobeurteilung bei CON gestaltete sich deutlich schwieriger, da sich die Kälber stets in das Iglu zurückziehen konnten, weswegen das Aufzeichnen aller Verhaltensänderungen nicht lückenlos möglich war. Ein ständiges Heraustreiben aus dem Iglu hätte für die Kälber zu Stress geführt und damit unsere Ergebnisse negativ beeinflusst. Da auch die Präsenz von Menschen einen erheblichen Stressfaktor für Rinder darstellen können (HEMSWORTH & COLEMAN, 2010), kann sich die Anwesenheit einer beobachtenden Person auf das Verhalten der Tiere und folglich auf die Ergebnisse der Ethogramme auswirken (FRASER & BROOM, 1990). In unserem Fall erforderte die Versuchsanordnung für Kälber unter STRESS die Anwesenheit von drei Personen: Eine Person zur Bewertung von Verhaltensparametern und zur Entnahme von Blut- und Speichelproben, eine Person, um mögliche Fluchtversuche zu verhindern (vor dem Kalb stehend), und eine Person zur Durchführung der ultrasonographischen Untersuchung. In dieser Phase des Versuchs war immer die gleiche Anzahl von Personen anwesend, um die Auswirkungen der Anzahl der Beobachter*innen auf das Verhalten der Kälber zu verringern. In der Gruppe der CON-Kälber wurde nur eine Person für die Probenahme und die Verhaltensbeurteilung benötigt. Da die Speichelproben so schnell wie möglich verarbeitet werden mussten, war das regelmäßige Abholen der Proben durch das Laborpersonal, und das damit verbundene wiederholte Betreten des Versuchsraums bzw. die Annäherung an das Iglu, unerlässlich. Dies stellt eine Einschränkung

unserer Studie dar, da die Möglichkeit zur Beeinflussung des Verhaltens der Kälber gegeben war. Die Videoaufzeichnungen und die Häufigkeit der Verhaltensweisen wurden immer von derselben Beobachterin ausgewertet. Aufgrund des Versuchsaufbaus war eine Verblindung der Gruppenzuordnung gegenüber der Beobachterin nicht möglich, was eine wesentliche Einschränkung der Verhaltensbeurteilung darstellt. Um Verzerrungen bei der Bewertung zu vermeiden, wird eine Verblindung empfohlen (FRASER & BROOM, 1990; MARTI et al., 2017).

1.10. Aktivität und Anzahl der Schritte

Der Einsatz von Pedometern in der Viehzucht bietet, neben einer Reihe von Vorteilen für die Umwelt, die sich aus der Optimierung des Tier- und Ressourcenmanagements ergeben (BONFANTI et al., 2025), auch Informationen über die Anzahl der Schritte, die ein Rind in einem bestimmten Zeitraum macht (MAZRIER et al., 2006). Ergebnisse von BOISSY and BOUISSOU (1995) deuten darauf hin, dass eine verringerte Bewegungsaktivität bei Färsen auf eine hohe Ängstlichkeit hinweist. Laut DEVANT et al. (2012) hat auch der mit einer Kastration verbundene Stress eine dauerhafte Auswirkung in Form einer Verringerung der körperlichen Aktivität.

In unserer Studie unterschieden sich die Aktivität und die Anzahl der Schritte nicht signifikant zwischen beiden Gruppen. Wie bereits erörtert, könnte dies mit einem unzureichenden Stressreiz zusammenhängen. In der vorliegenden Studie wurde aufgrund technischer Probleme mit den Batterien des Pedometers nur eine geringe Menge an Daten gewonnen, was die Verwendung unserer Daten einschränkt. Abgesehen von der ultrasonographischen Untersuchung, bei der die Kälber im Zwangsstand waren, und der Bewegung vom Iglu zum Versuchsraum und zurück, waren alle Kälber auf die gleiche Weise untergebracht. Dies macht den Einfluss von Umweltfaktoren, wie von THEURER et al. (2012) beschrieben, unwahrscheinlich. Die Ruhigstellung und Bewegung der Kälber in der STRESS-Gruppe könnte einen möglichen Einfluss auf unsere Studienergebnisse haben. Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren könnten auf mögliche Krankheiten zurückzuführen sein, die am Versuchstag noch nicht diagnostiziert waren. In einer Studie von DUTHIE et al. (2021) wurde festgestellt, dass Unterschiede in der Aktivität bereits an den Tagen vor dem Höhepunkt der Erkrankung zu beobachten

waren. Darüber hinaus kommt es auch bei Krankheiten wie z. B. einer Lungenentzündung zu einer Verringerung der Schrittzahl (HANZLICEK et al., 2010).

1.11. Milchaufnahme

Die Gesamtmilchaufnahme unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. Die Milchaufnahme wurde als Gesamtprozentsatz angegeben, um jeglichen Einfluss der Anzahl der Fütterungen auf unsere Ergebnisse zu reduzieren, da das Fütterungsmanagement bei zwei Kälbern aufgrund der Fütterung auf dem Herkunftsbetrieb unterschiedlich war (CON, Kälber 4 und 5).

Stress (SUTHERLAND et al., 2018), aber auch Hitzestress (DADO-SENN et al., 2020) können zu Veränderungen der Milchaufnahme führen. Da sich Futter- und Milchaufnahme zwischen CON und STRESS nicht unterschieden, kann davon ausgegangen werden, dass der Stimulus in STRESS nicht stressig genug war, um die Milchaufnahme negativ zu beeinflussen. Tierindividuelle Schwankungen und Schwankungen innerhalb der Tiere einer Gruppe könnten darauf zurückzuführen sein, das aufgrund des Arbeitsalltags in der Klinik an den einzelnen Versuchstagen unterschiedliche Pfleger*innen für die Fütterung der Kälber zuständig waren. Einige Pfleger*innen waren bei der Fütterung der Kälber geduldiger und enthusiastischer als andere, was die Milchaufnahme beeinflusst haben könnte. Nach WAIBLINGER et al. (2003); EBINGHAUS et al. (2018) besteht ein Zusammenhang zwischen der Einstellung und dem Verhalten der betreuenden Person gegenüber den Tieren und dem Grad der Angst der Tiere vor dem Menschen.

In der vorliegenden Studie wurde die Futteraufnahme zusätzlich zur täglichen Untersuchung und der Bestimmung der Leukozytenzahl am Tag 0 (Tag vor dem Versuch) beobachtet, um den Gesundheitszustand der Kälber zu beurteilen. SUTHERLAND et al. (2018) hält es für wahrscheinlich, dass die Fütterung einer höheren Milchmenge die Empfindlichkeit des Fressverhaltens als Maß für Stress (z. B. Schmerzen und Krankheit) bei Kälbern erhöht. Viele Krankheiten bei Rindern haben Auswirkung auf die Futteraufnahme (BAREILLE et al., 2003), wobei akute Krankheiten zu einer reduzierten Futter- und Wasseraufnahme führen (MILLMAN, 2007). Eine Studie von DUTHIE et al. (2021) ergab, dass kranke Kälber im Vergleich zu gesunden Kälbern kürzere Fütterungszeiten und weniger

Tränkebesuche (mit Futteraufnahme) pro Tag zeigte.

V. FAZIT

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie kann folgendes Fazit gezogen werden:

- Ein akutes, kurzfristiges Stressereignis (Fixation im Zwangsstand und ultrasonographische Untersuchung des Herzens für 30 Minuten) führt nicht zu einem Anstieg, sondern zu einem Abfall der PSPC bei Kälbern. Die PCC und die Glukosekonzentrationen zu den einzelnen Zeitpunkten unterscheiden sich zwischen den Gruppen.
- Speichelproben scheinen keine geeignete Matrix für die Bewertung der SP-Konzentrationen bei Kälbern zu sein, da 34 % der Proben nicht korrekt analysiert werden konnten.
- Es ließ sich keine Korrelation zwischen den PSPC und den SSPC nachweisen.
- PSPC und PCC zeigten eine positive und signifikante Korrelation.
- Mit Hilfe eines Ethogramms konnte eine signifikante Zunahme der Ohr- und Gliedmaßenbewegungen sowie der Häufigkeit des Urinabsatzes bei gestressten Tieren festgestellt werden. Dies deutet auf die Wichtigkeit der Verhaltensbeobachtung als Instrument zur Bewertung der Tiere, hin.
- Weitere Untersuchungen bei Rindern sind nötig, um Auswirkungen von chronischem Stress auf die PSPC zu untersuchen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Die Beurteilung von Schmerzen bei Rindern ist schwierig. Cortisol gilt seit langem als wichtiger objektive Parameter für die Bewertung von Stress und Nozizeption, aber auch Substanz P (SP), ein Neurotransmitter der Tachykinin-Familie, wurde als objektiver Biomarker für Nozizeption bei Rindern beschrieben. Vor allem simultane Messungen der Plasmakonzentrationen von SP und Cortisol könnten sich zur Differenzierung zwischen Stress und Nozizeption als nützlich erweisen. Laut Studien aus der Humanmedizin kann nicht nur Nozizeption, sondern auch Stress und Entzündungen zu einem Anstieg der SP-Konzentrationen führen. Im Rahmen der Grundlagenforschung zu SP als Biomarker für Nozizeption bei Rindern war es das Ziel dieser Studie 1) Die SP-Konzentration im Blutplasma gesunder Kälber der Rasse Deutsches Fleckvieh, die einem Stressreiz ausgesetzt sind, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu bewerten, 2) Festzustellen, ob es eine Korrelation zwischen den SP-Konzentrationen in Blut- und Speichelproben gibt, und 3) Eine mögliche Korrelation von PSPC mit der Cortisolkonzentration im Blutplasma und Verhaltensänderungen während und nach dem Versuchszeitraum zu beschreiben.

Material und Methoden: Insgesamt wurden 24 männliche Kälber der Rasse Deutsches Fleckvieh im Alter von 32,6 ± 3,3 (28 bis 38) Tagen entweder einer Kontroll- (CON) oder einer Versuchsgruppe (STRESS) zugeordnet. Am Versuchstag wurden 13 Proben zur Bestimmung von SP-Konzentrationen im Plasma (PSPC) und Speichel (SSPC) und Cortisol- (PCC) und Glukosekonzentrationen aus dem Blut entnommen. Zusätzlich wurde vor jeder Probennahme eine Verhaltensbewertung durchgeführt. Die erste Probennahme erfolgte um 08:00 morgens. Um 08:45 Uhr wurden die Kälber der STRESS-Gruppe in einen Untersuchungsraum gebracht und mit einem Halfter am Kopf in einem Zwangsstand fixiert. Von 09:00 Uhr bis 09:30 Uhr wurden die Tiere der STRESS-Gruppe einem Stressreiz (Fixation im Zwangstand und ultrasonographische Untersuchung des Herzens) unterzogen. Von „0 min“ bis „35 min“ (09:00 bis 09:35 Uhr) wurde das Verhalten der Kälber mit einer Videokamera aufgezeichnet und mittels Ethogramm ausgewertet. Um 09:35 Uhr wurden die Kälber der STRESS-Gruppe wieder zurück in ihre Iglus gebracht. Die Kälber der CON-Gruppe verblieben für den gesamten Versuchszeitraum in ihren Iglus. Die Aktivität und die

Anzahl der Schritte wurde über einen Zeitraum von 24 h mittels Pedometer gemessen, und die Milchaufnahme wurde dokumentiert.

Ergebnisse: PSPC und PCC unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen. Bei STRESS waren die PSPC nach 5 und 20 Minuten signifikant niedriger als beim Basalwert „60 Minuten zuvor“. Die SSPC lagen bei 34 % der Proben unterhalb der Empfindlichkeit des ELISAs. Die SSPC waren bei CON im Vergleich zu STRESS nach 0, 5, 10, 20 und 30 Minuten sowie nach 2 Stunden signifikant höher. Bei STRESS waren die SSPC nach 30 Minuten signifikant niedriger als 60 Minuten zuvor. Es gab keine Korrelation zwischen PSPC und SSPC. Die PCC waren bei STRESS nach 20 Minuten signifikant höher als 60 Minuten zuvor und bei CON nach 10 und 25 Minuten signifikant niedriger als 60 Minuten zuvor. Die Glukosekonzentrationen waren bei STRESS im Vergleich zu CON nach 5 und 10 Minuten signifikant niedriger und unterschieden sich signifikant innerhalb der Gruppen. „Ohrbewegungen“, „Gliedmaßenbewegungen“ und „Urinieren“ waren bei STRESS signifikant höher als bei CON. Milchaufnahme und Aktivität unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen.

Diskussion: Ein akuter Stressreiz (ultrasonographische Untersuchung mit Fixation im Zwangsstand) führt nicht zu einem Anstieg, sondern sogar zu einem Abfall der PSPC-Werte. In der Stressgruppe fiel eine Zunahme an Ohr- und Gliedmaßenbewegungen, sowie der Häufigkeit des Urinierens auf, was auf tatsächlich empfundenen Stress hindeutet. Die Vermutung liegt nahe, dass ein stärkerer, oder länger andauernder Stressreiz möglicherweise andere Ergebnisse hervorgebracht hätte. Die Messung der SSPC bei Kälbern, scheint kein geeignetes Instrument zu sein, da 34 % der entnommenen Speichelproben nicht korrekt analysierbar waren. Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass sich SP nicht als Biomarker für akuten Stress beim Kalb eignet.

VII. SUMMARY

Background: Pain assessment in cattle is difficult. Cortisol has long been considered an important objective parameter for the assessment of stress and nociception, but substance P (SP), a neurotransmitter of the tachykinin family, has also been described as an objective biomarker for nociception in cattle. Simultaneous measurements of plasma concentrations of SP and cortisol could prove useful to differentiate between stress and nociception. According to studies in human medicine, nociception, as well as stress and inflammation can lead to an increase of SP. In the context of basic research on SP as a biomarker for nociception in cattle, the aims of this study were to 1) evaluate the SP concentration in blood plasma of healthy German Simmental calves exposed to a stress stimulus compared to a control group, 2) determine whether there is a correlation between SP concentrations in blood and saliva samples, 3) describe a possible correlation of PSPC with cortisol concentration in the blood plasma and behavioral changes during and after the trial.

Material and methods: A total of 24 male calves of the German Simmental breed aged 32.6 ± 3.3 (28 to 38) days were assigned to either a control (CON) or a trial group (STRESS). On the test day, 13 samples were taken to determine SP concentrations in plasma (PSPC) and saliva (SSPC), as well as cortisol (PCC) and glucose concentrations from the blood. Behavioral parameters were assessed before each sampling. The first sampling took place at 08:00 a.m. in the morning. At 08:45 a.m., STRESS calves were brought into an examination room and restrained in a crush. From 09:00 a.m. to 09:30 a.m., animals in the STRESS group were subjected to a stressful stimulus (restraint in a crush and ultrasonographic examination of the heart). From “0 min” to “35 min” (09:00 a.m. to 09:35 a.m.), the behavior of the calves was recorded with a video camera and evaluated using an ethogram. At 09:35 a.m., STRESS calves were returned to their igloos. The calves in the CON group remained in their igloos for the entire duration of the trial. Activity and number of steps were recorded over a 24-hour period using a pedometer, and milk intake was documented.

Results: PSPC and PCC did not differ between the groups. In STRESS, PSPC were significantly lower after 5 and 20 minutes than at the baseline, “60 minutes before”. SSPC were below the sensitivity of the ELISA in 34 % of the samples, and were

significantly higher in CON compared with STRESS at 0, 5, 10, 20 and 30 minutes and after 2 hours. In STRESS, the SSPCs were significantly lower after 30 minutes than after 60 minutes. There was no correlation between PSPC and SSPC. PCC were significantly higher in STRESS at 20 minutes than 60 minutes before and significantly lower in CON at 10 and 25 minutes than 60 minutes before. Glucose concentrations were significantly lower in STRESS compared to CON at 5 and 10 minutes and differed significantly within groups. “Ear movements”, “limb movements” and “urination” were significantly higher in STRESS compared with in CON. Milk intake and activity did not differ between groups.

Discussion: An acute stressful stimulus (ultrasonographic examination with fixation in a forced position) did not result in an increase, but a decrease in PSPC. There was an increase in ear and limb movements, as well as in the frequency of urination in SRESS calves, which indicates that animals were indeed experiencing stress. It is possible that a stronger or longer-lasting stress stimulus might have provided different results. The collection of saliva samples does not appear to be a suitable instrument to assess SP concentrations in cattle, as 34% of the samples could not be analyzed correctly. The results of the present study indicate that SP is no suitable indicator for stress in calves.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Aggleton JP. The contribution of the amygdala to normal and abnormal emotional states. Trends in Neurosciences 1993; 16: 328-33.

Aliakbari J, Sreedharan SP, Turck CW, Goetzl EJ. Selective localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in human eosinophils. Biochemical and Biophysical Research Communications 1987; 148: 1440-5.

Allen KA, Coetzee JF, Edwards-Callaway LN, Glynn H, Dockweiler J, KuKanich B, Lin H, Wang C, Fraccaro E, Jones M, Bergamasco L. The effect of timing of oral meloxicam administration on physiological responses in calves after cautery dehorning with local anesthesia. Journal of Dairy Science 2013; 96: 5194-205.

Altmann J. Observational Study of Behavior: Sampling Methods. Behaviour 1974; 49: 227-66.

Altuntaş SÇ, İpekçi T, Yakupoğlu G, Erin N. Changes in urine levels of substance P, vasoactive intestinal peptide and calcitonin-gene-related peptide in patients with urinary tract infections. Peptides 2014; 56: 151-5.

Amberger M (2009). Echokardiographische Untersuchungen von Kälbern der Rasse Deutsches Fleckvieh zur Ermittlung von Referenzwerten und Prüfung des Einflusses von Xylazin und Isofluran auf die Herzdimensionen. Diss. vet. med. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Anderson DE, Muir WW. Pain Management in Cattle. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 2005; 21: 623-35.

Arave CW, Albright JL. Cattle behavior1. Journal of Dairy Science 1981; 64: 1318-29.

Asmundson GJG, Katz J. Understanding the co-occurrence of anxiety disorders and chronic pain: state-of-the-art. Depression and Anxiety 2009; 26: 888-901.

Bale TL, Vale WW. CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 2004; 44: 525-57.

Bareille N, Beaudeau F, Billon S, Robert A, Faverdin P. Effects of health disorders on feed intake and milk production in dairy cows. Livestock Production Science 2003; 83: 53-62.

Barragan AA, Piñeiro JM, Schuenemann GM, Rajala-Schultz PJ, Sanders DE, Lakritz J, Bas S. Assessment of daily activity patterns and biomarkers of pain, inflammation, and stress in lactating dairy cows diagnosed with clinical metritis. Journal of Dairy Science 2018; 101: 8248-58.

Bates AJ, Eder P, Laven RA. Effect of analgesia and anti-inflammatory treatment on weight gain and milk intake of dairy calves after disbudding. New Zealand Veterinary Journal 2015; 63: 153-7.

Bauer AM, Quas JA, Boyce WT. Associations between physiological reactivity and children's behavior: advantages of a multisystem approach. Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics 2002; 23: 102-13.

Baumgard L, Wheelock J, Sanders S, Moore C, Green H, Waldron M, Rhoads R. Postabsorptive carbohydrate adaptations to heat stress and monensin supplementation in lactating Holstein cows. Journal of Dairy Science 2011; 94: 5620-33.

Boandl KE, Wohlt JE, Carsia RV. Effects of handling, administration of a local anesthetic, and electrical dehorning on plasma cortisol in Holstein calves. Journal of Dairy Science 1989; 72: 2193-7.

Boissy A, Bouissou M-F. Assessment of individual differences in behavioural reactions of heifers exposed to various fear-eliciting situations. Applied Animal Behaviour Science 1995; 46: 17-31.

Boissy A, Le Neindre P. Behavioral, Cardiac and Cortisol Responses to Brief Peer Separation and Reunion in Cattle. Physiology and Behavior 1997; 61: 693-9.

Bomzon A. Pain and Stress in Cattle: A Personal Perspective. Israel Journal of Veterinary Medicine 2011; 66: 12-20.

Bondy B, Baghai TC, Minov C, Schüle C, Schwarz MJ, Zwanzger P, Rupprecht R, Möller H-J. Substance P serum levels are increased in major depression: preliminary results. Biological Psychiatry 2003; 53: 538-42.

Bonfanti M, Selvaggi R, Pappalardo G, Bellia C, Pecorino B, Porto SMC. On the market appeal of smart pedometer-based services within dairy cow farms. Environmental and Sustainability Indicators 2025; 27: 100798.

Bost K, Breeding S, Pascual D. Modulation of the mRNAs encoding substance P and its receptor in rat macrophages by LPS. Regional Immunology 1992; 4: 105-12.

Breivik H, Borchgrevink PC, Allen SM, Rosseland LA, Romundstad L, Breivik Hals EK, Kvarstein G, Stubhaug A. Assessment of pain. British Journal of Anaesthesia 2008; 101: 17-24.

Bristow DJ, Holmes DS. Cortisol levels and anxiety-related behaviors in cattle. Physiology and Behavior 2007; 90: 626-8.

Burdick Sanchez NC, Carroll JA, Broadway PR, Hughes HD, Roberts SL, Richeson JT, Schmidt TB, Vann RC. Cattle temperament influences metabolism: metabolic response to glucose tolerance and insulin sensitivity tests in beef steers. Domestic Animal Endocrinology 2016; 56: 85-95.

Burns GA, Cummings JF. Neuropeptide distributions in the colon, cecum, and jejunum of the horse. The Anatomical Record 1993; 236: 341-50.

Bustamante HA, Rodriguez AR, Herzberg DE, Werner MP. Stress and pain response after oligofructose induced-lameness in dairy heifers. Journal of Veterinary Science 2015; 16: 405-11.

Butler RK, Finn DP. Stress-induced analgesia. Progress in Neurobiology 2009; 88: 184-202.

Cannon WB (1915) Bodily changes in pain, hunger, fear and rage: An account of recent researches into the function of emotional excitement. D Appleton & Company, New York.

Cannon WB. Stress and straines of homeostasis. American Journal of the Medical Sciences 1935; 189: 1-14.

Cerón JJ, Contreras-Aguilar MD, Escribano D, Martínez-Miró S, López-Martínez MJ, Ortín-Bustillo A, Franco-Martínez L, Rubio CP, Muñoz-Prieto A, Tvarijonaviciute A, López-Arjona M, Martínez-Subiela S, Tecles F. Basics for the potential use of saliva to evaluate stress, inflammation, immune system, and redox homeostasis in pigs. BMC Veterinary Research 2022; 18: 81.

Chang MM, Leeman SE, Niall HD. Amino-acid Sequence of Substance P. Nature New Biology 1971; 232: 86-7.

Chi G, Huang Z, Li X, Zhang K, Li G. Substance P regulation in epilepsy. Current Neuropharmacology 2018; 16: 43-50.

Chiwakata C, Brackmann B, Hunt N, Davidoff M, Schulze W, Ivell R. Tachykinin (substance-P) gene expression in Leydig cells of the human and mouse testis. Endocrinology 1991; 128: 2441-8.

Coetzee JF, Lubbers BV, Toerber SE, Gehring R, Thomson DU, White BJ, Apley MD. Plasma concentrations of substance P and cortisol in beef calves after castration or simulated castration. American Journal of Veterinary Research 2008; 69: 751-62.

Coetzee JF, Edwards LN, Mosher RA, Bello NM, O'Connor AM, Wang B, KuKanich B, Blasi DA. Effect of oral meloxicam on health and performance of beef steers relative to bulls castrated on arrival at the feedlot1. Journal of Animal Science 2012a; 90: 1026-39.

Coetzee JF, Mosher RA, KuKanich B, Gehring R, Robert B, Reinbold JB, White BJ. Pharmacokinetics and effect of intravenous meloxicam in weaned Holstein calves following scoop dehorning without local anesthesia. BMC Veterinary Research 2012b; 8: 153.

Coetzee JF, Mosher RA, Anderson DE, Robert B, Kohake LE, Gehring R, White BJ, Kukanich B, Wang C. Impact of oral meloxicam administered alone or in combination with gabapentin on experimentally induced lameness in beef calves. Journal of Animal Science 2014a; 92: 816-29.

Coetzee JF, Lechtenberg KF, Stock ML, Kukanich B. Pharmacokinetics and effect of intravenous nalbuphine in weaned Holstein calves after surgical castration. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 2014b; 37: 169-77.

Contreras-Aguilar MD, Escribano D, Quiles A, López-Arjona M, Cerón JJ, Martínez-Subiela S, Hevia ML, Tecles F. Evaluation of new biomarkers of stress in saliva of sheep. animal 2019; 13: 1278-86.

Cook NJ. Minimally invasive sampling media and the measurement of corticosteroids as biomarkers of stress in animals. Canadian Journal of Animal Science 2012; 92: 227-59.

Cooper C, Evans ACO, Cook S, Rawlings NC. Cortisol, progesterone and β-endorphin response to stress in calves. Canadian Journal of Animal Science 1995; 75: 197-201.

Costa JHC, Cantor MC, Neave HW. Symposium review: Precision technologies for dairy calves and management applications. Journal of Dairy Science 2021; 104: 1203-19.

Creutzinger K, Pempek J, Habing G, Proudfoot K, Locke S, Wilson D, Renaud D. Perspectives on the Management of Surplus Dairy Calves in the United States and Canada. Frontiers in Veterinary Science 2021; 8: 661453.

Creutzinger KC, Stookey JM, Marfleet TW, Campbell JR, Janz DM, Marqués FJ, Seddon YM. An investigation of hair cortisol as a measure of long-term stress in beef cattle: results from a castration study. Canadian Journal of Animal Science 2017; 97: 499-509.

Cuello AC, Kanazawa I. The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. Journal of Comparative Neurology 1978; 178: 129-56.

Culman J, Unger T. Central tachykinins: mediators of defence reaction and stress reactions. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 1995; 73: 885-91.

Currah JM, Hendrick SH, Stookey JM. The behavioral assessment and alleviation of pain associated with castration in beef calves treated with flunixin meglumine and caudal lidocaine epidural anesthesia with epinephrine. Canadian Veterinary Journal 2009; 50: 375-82.

Dado-Senn B, Ouellet V, Dahl GE, Laporta J. Methods for assessing heat stress in preweaned dairy calves exposed to chronic heat stress or continuous cooling. Journal of Dairy Science 2020; 103: 8587-600.

Dalla Costa E, Minero M, Lebelt D, Stucke D, Canali E, Leach MC. Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a Pain Assessment Tool in Horses Undergoing Routine Castration. PloS One 2014; 9: e92281.

Dallman MF, Akana SF, Cascio CS, Darlington DN, Jacobson L, Levin N (1987) Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. Proceedings of the 1986 Laurentian Hormone Conference. 113-73.

de Oliveira D, Keeling LJ. Routine activities and emotion in the life of dairy cows: Integrating body language into an affective state framework. PloS One 2018; 13: e0195674.

DeVane CL. Substance P: A New Era, a New Role. Pharmacotherapy 2001; 21: 1061-9.

Devant M, Marti S, Bach A. Effects of castration on eating pattern and physical activity of Holstein bulls fed high-concentrate rations under commercial conditions. Journal of Animal Science 2012; 90: 4505-13.

Dionysakopoulou C, Lianou L, Boutopoulou B, Giannakopoulou M, Vlachioti E, Koumpagioti D, Bozas E, Matziou V. The Role of Substance P, Neurokinin A, Neuropeptide Y, and Cortisol in Assessing Neonatal Pain. Neonatal Network 2023; 42: 65-71.

Dockweiler JC, Coetzee JF, Edwards-Callaway LN, Bello NM, Glynn HD, Allen KA, Theurer ME, Jones ML, Miller KA, Bergamasco L. Effect of castration method on neurohormonal and electroencephalographic stress indicators in Holstein calves of different ages. Journal of Dairy Science 2013; 96: 4340-54.

Domeneghini C, Radaelli G, Arrighi S, Bosi G, Dolera M. Cholinergic, nitrergic and peptidergic (Substance P- and CGRP-utilizing) innervation of the horse intestine. A histochemical and immunohistochemical study. Histology and Histopathology 2004: 357-70.

Dubé C, Ribble C, Kelton D. An analysis of the movement of dairy cattle through 2 large livestock markets in the province of Ontario, Canada. Canadian Veterinary Journal 2010; 51: 1254-60.

Duthie CA, Bowen JM, Bell DJ, Miller GA, Mason C, Haskell MJ. Feeding behaviour and activity as early indicators of disease in pre-weaned dairy calves. animal 2021; 15: 100150.

Džermeikaitė K, Bačėninaitė D, Antanaitis R. Innovations in Cattle Farming: Application of Innovative Technologies and Sensors in the Diagnosis of Diseases. Animals (Basel) 2023; 13.

Ebinghaus A, Ivemeyer S, Knierim U. Human and farm influences on dairy cows´ responsiveness towards humans - a cross-sectional study. PloS One 2018; 13: e0209817.

Ebner K, Singewald N. The role of substance P in stress and anxiety responses. Amino Acids 2006; 31: 251-72.

Ebner K, Muigg P, Singewald G, Singewald N. Substance P in stress and anxiety: NK-1 receptor antagonism interacts with key brain areas of the stress circuitry. Annals of the New York Academy of Sciences 2008; 1144: 61-73.

Egloff N, Mueller DB, Orlof AM, grosse Holtforth M, Blaettler LT. Die Kopplung von Schmerz, Angst und Stress. Praxis 2021; 110: 263-7.

Emson PC, Arregui A, Clement-Jones V, Sandberg BEB, Rossor M. Regional distribution of methionine-enkephalin and substance P-like immunoreactivity in normal human brain and in Huntington's disease. Brain Research 1980; 199: 147-60.

Engel GL, Schmale AH (1972) Conservation-withdrawal: a primary regulatory process for organismic homeostasis. Ciba Foundation Symposium 8-Physiology, Emotion and Psychosomatic Illness. 57-85.

Erspamer V. Amphibian skin peptides in mammals—looking ahead. Trends in Neurosciences 1983; 6: 200-1.

Euler UV, Gaddum JH. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. The Journal of physiology 1931; 72: 74.

Feist M, Koestlin R, Nuss K. Claw surgery in cattle: The benefit of perioperative analgesics. Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere / Nutztiere 2008; 36: 367-76.

Feist M, Tschoner T. Ansätze zur Schmerzbeobachtung bei Kälbern – ein Überblick. veterinär spiegel 2023; 33: 64-73.

Ford GK, Finn DP. Clinical correlates of stress-induced analgesia: Evidence from pharmacological studies. Pain 2008; 140: 3-7.

Forkman B, Boissy A, Meunier-Salaün M-C, Canali E, Jones RB. A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. Physiology and Behavior 2007; 92: 340-74.

Fraser AF, Broom DM (1990) Describing, recording and measuring behaviour. In: Farm animal behaviour and welfare, 3. edn. Fraser A, Broom D, eds. CAB International 1990: 7-16.

Fraser D, Fraser AF, Ritchie JSD. The Term “Stress” in a Veterinary Context. British Veterinary Journal 1975; 131: 653-62.

Frederiksen EH, Ramirez MVR, Moreno-Hay I, Miller CS, Carlson CR. Whole unstimulated salivary flow rate decreases during acute stressful condition. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology 2024; 137: 594-603.

Gaddum JH, Schild H. Depressor substances in extracts of intestine. The Journal of physiology 1934; 83: 1-14.

Gaeta NC, Ribeiro BLM, Alemán MAR, Yoshihara E, Nassar AFC, Marques LM, Timenetsky J, Gregory L. Bacterial pathogens of the lower respiratory tract of calves from Brazilian rural settlement herds and their association with clinical signs of bovine respiratory disease. Pesquisa Veterinária Brasileira 2018; 38.

Gai WP, Halliday GM, Blumbergs PC, Geffen LB, Blessing WW. Substance P-containing neurons in the mesopotine tegmentum are severely affected in Parkinson´s disease. Brain 1991; 114: 2253-67.

Gaughan J, Holt SM, Hahn G, Mader T, Eigenberg RA. Respiration rate—is it a good measure of heat stress in cattle? Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 2000; 13.

Geracioti TD, Carpenter LL, Owens MJ, Baker DG, Ekhator NN, Horn PS, Strawn JR, Sanacora G, Kinkead B, Price LH, Nemeroff CB. Elevated Cerebrospinal Fluid Substance P Concentrations in Posttraumatic Stress Disorder and Major Depression. American Journal of Psychiatry 2006; 163: 637-43.

Gerrits WJJ. Symposium review: Macronutrient metabolism in the growing calf. Journal of Dairy Science 2019; 102: 3684-91.

Ghaffari MH, MacPherson JAR, Berends H, Steele MA. Diurnal variation of NMR based blood metabolites in calves fed a high plane of milk replacer: a pilot study. BMC Veterinary Research 2017; 13: 271.

Ghodasara P, Satake N, Sadowski P, Kopp S, Mills PC. Investigation of cattle plasma proteome in response to pain and inflammation using next generation proteomics technique, SWATH-MS. Molecular Omics 2022; 18: 133-42.

Gholami N, Hosseini Sabzvari B, Razzaghi A, Salah S. Effect of stress, anxiety and depression on unstimulated salivary flow rate and xerostomia. Journal of dental research, dental clinics, dental prospects 2017; 11: 247-52.

Gigliuto C, De Gregori M, Malafoglia V, Raffaeli W, Compagnone C, Visai L, Petrini P, Avanzini MA, Muscoli C, Viganò J, Calabrese F, Dominioni T, Allegri M, Cobianchi L. Pain assessment in animal models: do we need further studies? Journal of Pain Research 2014; 7: 227-36.

Gleerup KB, Andersen PH, Munksgaard L, Forkman B. Pain evaluation in dairy cattle. Applied Animal Behaviour Science 2015a; 171: 25-32.

Gleerup KB, Forkman B, Lindegaard C, Andersen PH. An equine pain face. Veterinary Anaesthesia and Analgesia 2015b; 42: 103-14.

Gleerup KB (2017) Identifying Pain Behaviors in Dairy Cattle. Conference paper. Western Canadian Dairy Seminar at: Red Deer, Alberta, CanadaVolume: 35.

González-de-la-Vara Mdel R, Valdez RA, Lemus-Ramirez V, Vázquez-Chagoyán JC, Villa-Godoy A, Romano MC. Effects of adrenocorticotropic hormone challenge and age on hair cortisol concentrations in dairy cattle. Canadian Journal of Veterinary Research 2011; 75: 216-21.

Grandin T. Behavioral agitation during handling of cattle is persistent over time. Applied Animal Behaviour Science 1993; 36: 1-9.

Grandin T. Assessment of Stress during Handling and Transport. Journal of Animal Science 1997; 75: 249-57.

Grignard L, Boissy A, Boivin X, Garel JP, Le Neindre P. The social environment influences the behavioural responses of beef cattle to handling. Applied Animal Behaviour Science 2000; 68: 1-11.

Grisneaux E, Pibarot P, Dupuis J, Blais D. Comparison of ketoprofen and carprofen administered prior to orthopedic surgery for control of postoperative pain in dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association 1999; 215: 1105-10.

Gröschl M. Current status of salivary hormone analysis. Clinical Chemistry 2008; 54: 1759-69.

Gruber N, Gesell-May S, Scholler D, Zablotski Y, May A. Evaluation of substance P as a biomarker for pain in equine colic. Journal of Equine Veterinary Science 2024; 132: 104979.

Guesgen MJ (2015) The social function of pain-related behaviour and novel techniques for the assessment of pain in lambs: a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Zoology at Massey University, Turitea campus, Manawatu, New Zealand.

Guesgen MJ, Beausoleil N, Minot E, Stewart M, Stafford K, Morel P. Lambs show changes in ear posture when experiencing pain. Animal Welfare 2016; 25: 171-7.

Guidi J, Lucente M, Sonino N, Fava GA. Allostatic load and its impact on health: a systematic review. Psychotherapy and Psychosomatics 2020; 90: 11-27.

Gunnar M, Quevedo K. The Neurobiology of Stress and Development. Annual Review of Psychology 2006; 58: 145-73.

Haefeli M, Elfering A. Pain assessment. European Spine Journal 2006; 15: 17-24.

Hagen K, Langbein J, Schmied C, Lexer D, Waiblinger S. Heart rate variability in dairy cows—influences of breed and milking system. Physiology and Behavior 2005; 85: 195-204.

Hahn G, Parkhurst A, Gaughan J. Cattle respiration rate as a function of ambient temperature. ASAE Paper NMC97 1997; 121.

Haley DB, Bailey DW, Stookey JM. The effects of weaning beef calves in two stages on their behavior and growth rate. Journal of Animal Science 2005; 83: 2205-14.

Hammon HM, Sauter SN, Reist M, Zbinden Y, Philipona C, Morel C, Blum JW. Dexamethasone and colostrum feeding affect hepatic gluconeogenic enzymes differently in neonatal calves. Journal of Animal Science 2003; 81: 3095-106.

Hanzlicek GA, White BJ, Mosier D, Renter DG, Anderson DE. Serial evaluation of physiologic, pathological, and behavioral changes related to disease progression of experimentally induced Mannheimia haemolytica pneumonia in postweaned calves. American Journal of Veterinary Research 2010; 71: 359-69.

Hasan I, Noman Z, Sikder DM, Sachi S, Arif M. Prevalence of Calf Diseases in Different Dairy Farms of Bangladesh. Bangladesh Journal of Veterinary Medicine Records 2017; 3: 19-26.

Hawker GA, Mian S, Kendzerska T, French M. Measures of adult pain: Visual Analog Scale for Pain (VAS Pain), Numeric Rating Scale for Pain (NRS Pain), McGill Pain Questionnaire (MPQ), Short-Form McGill Pain Questionnaire (SF-MPQ), Chronic Pain Grade Scale (CPGS), Short Form-36 Bodily Pain Scale (SF-36 BPS), and Measure of Intermittent and Constant Osteoarthritis Pain (ICOAP). Arthritis Care & Research 2011; 63 Suppl 11: S240-52.

Heimbürge S, Kanitz E, Tuchscherer A, Otten W. Is it getting in the hair? - Cortisol concentrations in native, regrown and segmented hairs of cattle and pigs after repeated ACTH administrations. General and Comparative Endocrinology 2020; 295: 113534.

Heinrich A, Duffield TF, Lissemore KD, Squires EJ, Millman ST. The impact of meloxicam on postsurgical stress associated with cautery dehorning. Journal of Dairy Science 2009; 92: 540-7.

Heinrich A, Duffield TF, Lissemore KD, Millman ST. The effect of meloxicam on behavior and pain sensitivity of dairy calves following cautery dehorning with a local anesthetic. Journal of Dairy Science 2010; 93: 2450-7.

Hemsworth PH, Coleman GJ (2010) Human-livestock interactions: The stockperson and the productivity of intensively farmed animals. CABI.

Henke J, Erhardt W (2001) Schmerzmanagement bei Klein-und Heimtieren. Georg Thieme Verlag. 1-4.

Henry JP, Stephens PM (1977) Functional and structural changes in response to psychosocial stimulation. Stress, Health, and the Social Environment. New York, NY. 141-66.

Ho W-Z, Lai J-P, Zhu X-H, Uvaydova M, Douglas SD. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950) 1997; 159: 5654-60.

Hökfelt T, Kellerth JO, Nilsson G, Pernow B. Substance p: localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. Science 1975; 190: 889-90.

Hopster H (1998) Coping strategies in dairy cows. Ph.D. dissertation from Wageningen University & Research.

Hudson C, Whay H, Huxley J. Recognition and management of pain in cattle. In Practice 2008; 30: 126-34.

Hugonnard M, Leblond A, Keroack S, Cadoré JL, Troncy E. Attitudes and concerns of French veterinarians towards pain and analgesia in dogs and cats. Veterinary Anaesthesia and Analgesia 2004; 31: 154-63.

Hunt SP, Mantyh PW. The molecular dynamics of pain control. Nature reviews neuroscience 2001; 2: 83-91.

Huxley JN, Whay HR. Current attitudes of cattle practitioners to pain and the use of analgesics in cattle. Veterinary Record 2006; 159: 662-8.

Hwang BH, Katner J, Iyengar S. Corticotropin-releasing factor mRNA and substance P receptor binding in the paraventricular hypothalamic nucleus, central nucleus of the amygdala, and locus coeruleus of Sprague-Dawley rats following restraint-induced stress. Journal of Molecular Neuroscience 2005; 25: 239-50.

Iftikhar K, Siddiq A, Baig SG, Zehra S. Substance P: A neuropeptide involved in the psychopathology of anxiety disorders. Neuropeptides 2020; 79: 101993.

Imbe H, Iwai-Liao Y, Senba E. Stress-induced hyperalgesia: animal models and putative mechanisms. Frontiers in Bioscience-Landmark 2006; 11: 2179-92.

Ishiwata T, Kilgour R, Uetake K, Eguchi Y, Tanaka T. Choice of attractive conditions by beef cattle in a Y-maze just after release from restraint: Effect of sheep. Animal Science Journal 2006; 77: 363-9.

Iversen L. Substance P equals pain substance? Nature 1998; 392: 334-5.

Jasim H, Carlsson A, Hedenberg-Magnusson B, Ghafouri B, Ernberg M. Saliva as a medium to detect and measure biomarkers related to pain. Scientific Reports 2018; 8: 3220.

Jennings EM, Okine BN, Roche M, Finn DP. Stress-induced hyperalgesia. Progress in Neurobiology 2014; 121: 1-18.

Jensen MP, Karoly P, Braver S. The measurement of clinical pain intensity: a comparison of six methods. Pain 1986; 27: 117-26.

Jessell T. Neurotransmitters and CNS disease. Pain (a review). Nature 1982; 299: 469-74.

Joachim RA, Hildebrandt M, Oder J, Klapp BF, Arck PC. Murine stress-triggered abortion is mediated by increase of CD8+ TNF-alpha+ decidual cells via substance P. American Journal of Reproductive Immunology 2001; 45: 303-9.

Joachim RA, Sagach V, Quarcoo D, Dinh T, Arck PC, Klapp BF. Upregulation of tumor necrosis factor-alpha by stress and substance p in a murine model of allergic airway inflammation. Neuroimmunomodulation 2006; 13: 43-50.

Johansson P, Almqvist EG, Wallin A, Johansson J-O, Andreasson U, Blennow K, Zetterberg H, Svensson J. Cerebrospinal fluid substance P concentrations are elevated in patients with Alzheimer's disease. Neuroscience Letters 2015; 609: 58-62.

Johnson CB, Gibson T, Flint P, Wilson PW, Mellor DJ. New techniques for pain recognition: What are the applications, where are the limits? Proceedings of the AAWS International Animal Welfare Conference 2008.

Johnson KF, Chancellor N, Wathes DC. A Cohort Study Risk Factor Analysis for Endemic Disease in Pre-Weaned Dairy Heifer Calves. Animals 2021; 11: 378.

Johnston CH, Whittaker AL, Franklin SH, Hutchinson MR. The Neuroimmune Interface and Chronic Pain Through the Lens of Production Animals. Frontiers in Neuroscience 2022; 16: 887042.

Jurkovich V, Hejel P, Kovács L. A Review of the Effects of Stress on Dairy Cattle Behaviour. Animals 2024; 14: 2038.

Justice FMo (2023) TierSchTrV §10 subsection 4. Ordinance on the protection of animals during transport and on the implementation of Council Regulation (EC) No 1/2005 1) 2) (Animal Welfare Transport Ordinance - TierSchTrV). Last amendment to subsection 4 in January 2023.

Karlen KJ, Reyes F, Odegard S, Baumann R, Coetzee J, Vogel K. Efficacy of oral meloxicam as primary pain mitigation following caustic paste disbudding of three day old Holstein calves1. Translational Animal Science 2019; 5: 423–9.

Karlen KJ, Baier FS, Odegard SL, Baumann RM, Coetzee JF, Kehoe SI, Vogel KD. Efficacy of oral meloxicam as primary pain mitigation following caustic paste disbudding of three day old Holstein calves(1). Translational Animal Science 2021; 5: 1-8.

Kasimanickam R, Kasimanickam V, Gold J, Moore D, Kastelic JP, Pyrdek D, Ratzburg K. Injectable or transdermal flunixin meglumine improves pregnancy rates in embryo transfer recipient beef cows without altering returns to estrus. Theriogenology 2019; 140: 8-17.

Kasimanickam RK, Hall JB, Estill CT, Kastelic JP, Joseph C, Abdel Aziz RL, Nak D. Flunixin meglumine improves pregnancy rate in embryo recipient beef cows with an excitable temperament. Theriogenology 2018; 107: 70-7.

Kawana S, Liang Z, Nagano M, Suzuki H. Role of substance P in stress-derived degranulation of dermal mast cells in mice. Journal of Dermatological Science 2006; 42: 47-54.

Keating SCJ, Thomas AA, Flecknell PA, Leach MC. Evaluation of EMLA Cream for Preventing Pain during Tattooing of Rabbits: Changes in Physiological, Behavioural and Facial Expression Responses. PloS One 2012; 7: e44437.

Kielland C, Skjerve E, Zanella A. Attitudes of veterinary students to pain in cattle. Veterinary Record 2009; 165: 254-8.

Kielland C, Skjerve E, Østerås O, Zanella AJ. Dairy farmer attitudes and empathy toward animals are associated with animal welfare indicators. Journal of Dairy Science 2010; 93: 2998-3006.

Kirker-Head CA, Chandna VK, Agarwal RK, Morris EA, Tidwell A, O'Callaghan MW, Rand W, Kumar MSA. Concentrations of substance P and prostaglandin E2 in synovial fluid of normal and abnormal joints of horses. American Journal of Veterinary Research 2000; 61: 714-8.

Ko KR, Lee H, Han S-H, Ahn W, Kim DK, Kim I-S, Jung BS, Lee S. Substance P, A Promising Therapeutic Target in Musculoskeletal Disorders. International Journal of Molecular Sciences 2022; 23: 2583.

Kovács L, Kézér FL, Jurkovich V, Kulcsár-Huszenicza M, Tőzsér J. Heart Rate Variability as an Indicator of Chronic Stress Caused by Lameness in Dairy Cows. PloS One 2015a; 10: e0134792.

Kovács L, Kézér FL, Tőzsér J, Szenci O, Póti P, Pajor F. Heart Rate and Heart Rate Variability in Dairy Cows with Different Temperament and Behavioural Reactivity to Humans. PloS One 2015b; 10: e0136294.

Krohne HW. Die Stressreaktion. In: Stress und Stressbewältigung bei Operationen. Krohne HW, ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2017: 7-40.

Lai J-P, Douglas SD, Rappaport E, Wu JM, Ho W-Z. Identification of a δ isoform of preprotachykinin mRNA in human mononuclear phagocytes and lymphocytes. Journal of Neuroimmunology 1998; 91: 121-8.

Lamy E, Mau M. Saliva proteomics as an emerging, non-invasive tool to study livestock physiology, nutrition and diseases. Journal of Proteomics 2012; 75: 4251-8.

Landinger A, Zablotski Y, Knubben-Schweizer G, Tschoner T. Evaluation of Substance P concentrations in the blood plasma of jugular and tail vein of healthy German Simmental cows. BMC Veterinary Research 2023; 19: 218.

Landinger A, Zablotski Y, Knubben-Schweizer G, Tschoner T. Comparison of plasma substance P concentrations in the blood of healthy male and female German Simmental calves. BMC Veterinary Research 2024; 20: 226.

Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, Glick S, Ingrao J, Klassen-Ross T, LaCroix-Fralish ML, Matsumiya L, Sorge RE, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wong D, van den Maagdenberg AMJM, Ferrari MD, Craig KD, Mogil JS. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. Nature Methods 2010; 7: 447-9.

Lascelles B, Cripps P, Jones A, Waterman A. Post-operative central hypersensitivity and pain: the pre-emptive value of pethidine for ovariohysterectomy. Pain 1997; 73: 461-71.

Lauder JK, Marti S, Schwartzkopf-Genswein KS, Jelinski MD, Janzen ED. Measuring behavioral and physiological responses to pain mitigation for ovariectomy in Bos taurus yearling beef heifers. Journal of Animal Science 2020; 98.

Laven R, Huxley J, Whay H, Stafford K. Results of a survey of attitudes of dairy veterinarians in New Zealand regarding painful procedures and conditions in cattle. New Zealand Veterinary Journal 2009; 57: 215-20.

Lazarus RS, Launier R. Stress-Related Transactions between Person and Environment. In: Perspectives in Interactional Psychology. Pervin LA, Lewis M, eds. Boston, MA: Springer US 1978: 287-327.

Leach MC, Klaus K, Miller AL, Scotto di Perrotolo M, Sotocinal SG, Flecknell PA. The Assessment of Post-Vasectomy Pain in Mice Using Behaviour and the Mouse Grimace Scale. PloS One 2012; 7: e35656.

LeDoux JE (1998) The emotional brain: The mysterious underpinnings of emotional life. Simon and Schuster. 225-67.

Lembeck F. Zur Frage der zentralen Übertragung afferenter Impulse: III. Mitteilung. Das Vorkommen und die Bedeutung der Substanz P in den dorsalen Wurzeln des Rückenmarks. Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie 1953; 219: 197-213.

Lensink BJ, Fernandez X, Cozzi G, Florand L, Veissier I. The influence of farmers' behavior on calves' reactions to transport and quality of veal meat. Journal of Animal Science 2001; 79: 642-52.

Lester SJ, Mellor DJ, Ward RN. Effects of repeated handling on the cortisol responses of young lambs castrated and tailed surgically. New Zealand Veterinary Journal 1991; 39: 147-9.

Linnik MD, Moskowitz MA. Identification of immunoreactive substance P in human and other mammalian endothelial cells. Peptides 1989; 10: 957-62.

Littlejohn BP, Price DM, Banta JP, Lewis AW, Neuendorff DA, Carroll JA, Vann RC, Welsh TH, Jr., Randel RD. Prenatal transportation stress alters temperament and serum cortisol concentrations in suckling Brahman calves. Journal of Animal Science 2016; 94: 602-9.

Ljungdahl A, Hökfelt T, Nilsson G. Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat--I. Cell bodies and nerve terminals. Neuroscience 1978; 3: 861-943.

Lovarelli D, Minozzi G, Arazi A, Guarino M, Tiezzi F. Effect of extended heat stress in dairy cows on productive and behavioral traits. animal 2024; 18: 101089.

Lu S, Wei F, Li G. The evolution of the concept of stress and the framework of the stress system. Cell Stress 2021; 5: 76-85.

Lundborg GK, Svensson EC, Oltenacu PA. Herd-level risk factors for infectious diseases in Swedish dairy calves aged 0–90 days. Preventive Veterinary Medicine 2005; 68: 123-43.

Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. Nature reviews neuroscience 2009; 10: 434-45.

Mack M. Umgang mit landwirtschatlichen Nutztieren aus der Sicht der Unfallverhuetung. Tierzuechter 1980; 32.

Marcato F, van den Brand H, Kemp B, Engel B, Schnabel SK, Jansen CA, Rutten VPMG, Koets AP, Hoorweg FA, de Vries-Reilingh G, Wulansari A, Wolthuis-Fillerup M, van Reenen K. Calf and dam characteristics and calf transport age affect immunoglobulin titers and hematological parameters of veal calves. Journal of Dairy Science 2022a; 105: 1432-51.

Marcato F, van den Brand H, Kemp B, Engel B, Schnabel SK, Hoorweg FA, Wolthuis-Fillerup M, van Reenen K. Effects of transport age and calf and maternal characteristics on health and performance of veal calves. Journal of Dairy Science 2022b; 105: 1452-68.

Marti S, Meléndez DM, Pajor EA, Moya D, Heuston CEM, Gellatly D, Janzen ED, Schwartzkopf-Genswein KS. Effect of band and knife castration of beef calves on welfare indicators of pain at three relevant industry ages: II. Chronic pain. Journal of Animal Science 2017; 95: 4367-80.

Mason JW. A Historical View of the Stress Field. Journal of Human Stress 1975a; 1: 22-36.

Mason JW. Emotion as reflected in patterns of endocrine integration. Emotions-their parameters and measurement 1975b: 143-81.

Mason JW. A Historical View of the Stress Field. Journal of Human Stress 1975c; 1: 6-12.

Mathews KA. Pain Assessment and General Approach to Management. Veterinary Clinics: Small Animal Practice 2000; 30: 729-55.

Mayer C (2019). Untersuchungen zur Schmerzäußerung bei Kälbern nach Schwanzspitzenamputation. Diss. vet. med. 2019; Ludwig-Maximilians-Universität München.

Mayer C, Zablotski Y, Rieger A, Knubben-Schweizer G, Feist M. Behavioural and physiological indicators of pain and distress in calves following tail docking. Tierarztliche Praxis. Ausgabe G: Grosstiere Nutztiere 2020; 48: 328-37.

Mazrier H, Tal S, Aizinbud E, Bargai U. A field investigation of the use of the pedometer for the early detection of lameness in cattle. Canadian Veterinary Journal 2006; 47: 883-6.

McEwen BS, Seeman T (2002) Stress and Affect: Applicability of the Concepts of Allostasis and Allostatic Load. In: Handbook of Affective Sciences. Oxford University Press. 1117-37.

McEwen BS, Wingfield JC. The concept of allostasis in biology and biomedicine. Hormones and Behavior 2003; 43: 2-15.

McEwen BS. Neurobiological and systemic effects of chronic stress. Chronic stress 2017; 1: 2470547017692328.

Meléndez DM, Marti S, Pajor EA, Moya D, Gellatly D, Janzen ED, Schwartzkopf-Genswein KS. Effect of timing of subcutaneous meloxicam administration on indicators of pain after knife castration of weaned calves. Journal of Animal Science 2017; 95: 5218-29.

Meléndez DM, Marti S, Pajor EA, Moya D, Gellatly D, Janzen ED, Schwartzkopf-Genswein KS. Effect of a single dose of meloxicam prior to band or knife castration in 1-wk-old beef calves: I. Acute pain. Journal of Animal Science 2018; 96: 1268-80.

Miller-Cushon E, Devries T. Invited review: Development and expression of dairy calf feeding behaviour. Canadian Journal of Animal Science 2015; 95: 341-50.

Millman ST. Sickness behaviour and its relevance to animal welfare assessment at the group level. Animal Welfare 2007; 16: 123-5.

Milner P, Kirkpatrick KA, Ralevic V, Toothill V, Pearson J, Burnstock G. Endothelial cells cultured from human umbilical vein release ATP, substance P and acetylcholine in response to increased flow. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences 1990; 241: 245-8.

Mintline EM, Varga A, Banuelos J, Walker KA, Hoar B, Drake D, Weary DM, Coetzee JF, Stock ML, Tucker CB. Healing of surgical castration wounds: a description and an evaluation of flunixin. Journal of Animal Science 2014; 92: 5659-65.

Mirra A, Spadavecchia C, Bruckmaier R, Gutzwiller A, Casoni D. Acute pain and peripheral sensitization following cautery disbudding in 1-and 4-week-old calves. Physiology and Behavior 2018; 184: 248-60.

Moberg G. Biological response to stress: implications for animal welfare: 2000: 1-21.

Mohr E, Langbein J, Nürnberg G. Heart rate variability: A noninvasive approach to measure stress in calves and cows. Physiology and Behavior 2002; 75: 251-9.

Molony V, Kent JE. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. Journal of Animal Science 1997; 75: 266-72.

Monroe SM. Modern approaches to conceptualizing and measuring human life stress. Annual Review of Clinical Psychology 2008; 4: 33-52.

Mormède P, Andanson S, Aupérin B, Beerda B, Guémené D, Malmkvist J, Manteca X, Manteuffel G, Prunet P, van Reenen CG. Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. Physiology and Behavior 2007; 92: 317-39.

Mudron P, Rehage J, Sallmann H-P, Höltershinken M, Scholz H. Stress Response in Dairy Cows Related to Blood Glucose. Acta Veterinaria Brno 2005; 74.

Nakaya Y, Kaneko T, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N. Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. Journal of Comparative Neurology 1994; 347: 249-74.

Netter P. Endokrine Systeme und Persönlichkeit. In: Biophysiologische Grundlagen der Persönlichkeit. München: 2005: 291-395.

Nicolodi M, Bianco ED. Sensory Neuropeptides (Substance P, Calcitonin Gene-Related Peptide) and Vasoactive Intestinal Polypeptide in Human Saliva: Their Pattern in Migraine and Cluster Headache. Cephalalgia 1990; 10: 39-50.

Norring M, Wikman I, Hokkanen A-H, Kujala MV, Hänninen L. Empathic veterinarians score cattle pain higher. The Veterinary Journal 2014; 200: 186-90.

Nugent SM, Lovejoy TI, Shull S, Dobscha SK, Morasco BJ. Associations of Pain Numeric Rating Scale Scores Collected during Usual Care with Research Administered Patient Reported Pain Outcomes. Pain Medicine 2021; 22: 2235-41.

O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. The role of substance P in inflammatory disease. Journal of Cellular Physiology 2004; 201: 167-80.

Ogino M, Matsuura A, Yamazaki A, Irimajiri M, Suzuki Y, Kushibiki S, Singu H, Kasuya E, Hasegawa Y, Hodate K. Plasma cortisol and prolactin secretion rhythms in cattle under varying external environments and management techniques. Animal Science Journal 2014; 85: 58-68.

Oishi K, Himeno Y, Miwa M, Anzai H, Kitajima K, Yasunaka Y, Kumagai H, Ieiri S, Hirooka H. Correcting the Activity-Specific Component of Heart Rate Variability Using Dynamic Body Acceleration Under Free-Moving Conditions. Frontiers in Physiology 2018; 9: 1063.

Olango WM, Finn DP. Neurobiology of Stress-Induced Hyperalgesia. In: Behavioral Neurobiology of Chronic Pain. Taylor BK, Finn DP, eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2014: 251-80.

Olson M, Ralston B, Burwash L, Matheson-Bird H, Allan ND. Efficacy of oral meloxicam suspension for prevention of pain and inflammation following band and surgical castration in calves. BMC Veterinary Research 2016; 12: 1-11.

Omidi-Mirzaei H, Khorvash M, Ghorbani GR, Moshiri B, Mirzaei M, Pezeshki A, Ghaffari MH. Effects of the step-up/step-down and step-down milk feeding procedures on the performance, structural growth, and blood metabolites of Holstein dairy calves. Journal of Dairy Science 2015; 98: 7975-81.

Pascual D, Bost K. Substance P production by P388D1 macrophages: a possible autocrine function for this neuropeptide. Immunology 1990; 71: 52.

Pauly C, White BJ, Coetzee J, Robert B, Baldridge S, Renter DG. Evaluation of analgesic protocol effect on calf behavior after concurrent castration and dehorning. International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine 2012; 10: 54-61.

Peinhofer VC (2013). Umfrage zur Schmerzbeurteilung und Schmerzbehandlung beim Rind durch bayerische Tierärzte und Landwirte, Diss. med. vet. 2013. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Pesenhofer G, Palme R, Pesenhofer RM. Comparison of two methods of fixation during functional claws trimming—walk-in crush versus tilt table—in dairy cows using faecal cortisol metabolite concentrations and daily milk yield as parameters. Wiener Tierarztliche Monatsschrift 2006; 93: 288-94.

Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. Clinical Chemistry 2011; 57: 675-87.

Pieler D, Peinhopf W, Becher A, Aurich J, Rose-Meierhöfer S, Erber R, Möstl E, Aurich C. Physiological and behavioral stress parameters in calves in response to partial scrotal resection, orchidectomy, and Burdizzo castration. Journal of Dairy Science 2013; 96: 6378-89.

Pinto S, Hoffmann G, Ammon C, Amon B, Heuwieser W, Halachmi I, Banhazi T, Amon T. Influence of Barn Climate, Body Postures and Milk Yield on the Respiration Rate of Dairy Cows. Annals of Animal Science 2019; 19: 469-81.

Polidoro G, Giancola F, Fracassi F, Pietra M, Bettini G, Asti M, Chiocchetti R. Substance P and the neurokinin-1 receptor expression in dog ileum with and without inflammation. Research in Veterinary Science 2017; 114: 297-307.

Polsky L, von Keyserlingk MAG. Effects of heat stress on dairy cattle welfare. Journal of Dairy Science 2017; 100: 8645-57.

Potter G, Guzman F, Lim R. Visceral pain evoked by intra-arterial injection of substance P. Nature 1962; 193: 983-4.

Probst JK, Hillmann E, Leiber F, Kreuzer M, Spengler Neff A. Influence of gentle touching applied few weeks before slaughter on avoidance distance and slaughter stress in finishing cattle. Applied Animal Behaviour Science 2013; 144: 14-21.

Proctor HS, Carder G. Can ear postures reliably measure the positive emotional state of cows? Applied Animal Behaviour Science 2014; 161: 20-7.

Pruessner JC, Dedovic K, Pruessner M, Lord C, Buss C, Collins L, Dagher A, Lupien SJ. Stress regulation in the central nervous system: evidence from structural and functional neuroimaging studies in human populations - 2008 Curt Richter Award Winner. Psychoneuroendocrinology 2010; 35: 179-91.

Prunier A, Mounier L, Le Neindre P, Leterrier C, Mormède P, Paulmier V, Prunet P, Terlouw C, Guatteo R. Identifying and monitoring pain in farm animals: a review. animal 2013; 7: 998-1010.

Rabey M, Moloney N. “I Don’t Know Why I’ve Got this Pain!” Allostasis as a possible explanatory model. Physical Therapy 2022; 102: 352–60.

Ralph C, Tilbrook A. Invited review: The usefulness of measuring glucocorticoids for assessing animal welfare. Journal of Animal Science 2016; 94: 457-70.

Reefmann N, Bütikofer Kaszàs F, Wechsler B, Gygax L. Ear and tail postures as indicators of emotional valence in sheep. Applied Animal Behaviour Science 2009; 118: 199-207.

Remnant JG, Tremlett A, Huxley JN, Hudson CD. Clinician attitudes to pain and use of analgesia in cattle: where are we 10 years on? Veterinary Record 2017; 181: 400.

Rhoads M, Rhoads R, VanBaale M, Collier R, Sanders S, Weber W, Crooker B, Baumgard L. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. Journal of Dairy Science 2009; 92: 1986-97.

Ribeiro-da-Silva A, Hökfelt T. Neuroanatomical localisation of Substance P in the CNS and sensory neurons. Neuropeptides 2000; 34: 256-71.

Rizk A, Herdtweck S, Offinger J, Meyer H, Zaghloul A, Rehage J. The use of xylazine hydrochloride in an analgesic protocol for claw treatment of lame dairy cows in lateral recumbency on a surgical tipping table. Veterinary Journal 2012a; 192: 193-8.

Rizk A, Herdtweck S, Meyer H, Offinger J, Zaghloul A, Rehage J. Effects of xylazine hydrochloride on hormonal, metabolic, and cardiorespiratory stress responses to lateral recumbency and claw trimming in dairy cows. Journal of the American Veterinary Medical Association 2012b; 240: 1223-30.

Roberts GW, Woodhams PL, Polak JM, Crow TJ. Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: the amygdaloid complex. Neuroscience 1982; 7: 99-131.

Rodriguez AR, Herzberg DE, Werner MP, Muller HY, Bustamante HA. Plasma Concentration of Norepinephrine, beta-endorphin, and Substance P in Lame Dairy Cows. Journal of veterinary research 2018; 62: 193-7.

Rohleder N, Wolf JM, Herpfer I, Fiebich BL, Kirschbaum C, Lieb K. No response of plasma substance P, but delayed increase of interleukin-1 receptor antagonist to acute psychosocial stress. Life Sciences 2006; 78: 3082-9.

Rupniak NM, Kramer MS. Discovery of the antidepressant and anti-emetic efficacy of substance P receptor (NK1) antagonists. Trends in Pharmacological Sciences 1999; 20: 485-90.

Rushen J, Taylor AA, De Passillé AM. Domestic animals' fear of humans and its effect on their welfare. Applied Animal Behaviour Science 1999a; 65: 285-303.

Rushen J, De Passille A, Munksgaard L. Fear of people by cows and effects on milk yield, behavior, and heart rate at milking. Journal of Dairy Science 1999b; 82: 720-7.

Rushen J, Boissy A, Terlouw EMC, de Passillé AMB. Opioid peptides and behavioral and physiological responses of dairy cows to social isolation in unfamiliar surroundings. Journal of Animal Science 1999c; 77: 2918-24.

Russell E, Koren G, Rieder M, Van Uum S. Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: current status, future directions and unanswered questions. Psychoneuroendocrinology 2012; 37: 589-601.

Russell IJ, Orr MD, Littman B, Vipraio GA, Alboukrek D, Michalek JE, Lopez Y, Mackillip F. Elevated cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with the fibromyalgia syndrome. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology 1994; 37: 1593-601.

Saeed D, Zahr R, Shalli S, Fumoto H, Horai T, Anzai T, Arakawa Y, Dessoffy R, Catanese J, Golding LA, Fukamachi K. Median sternotomy approach for chronic bovine experiments. American Society for Artificial Internal Organs 2008; 54: 585-8.

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. Endocrine Reviews 2000; 21: 55-89.

Schaible HG, Jarrott B, Hope PJ, Duggan AW. Release of immunoreactive substance P in the spinal cord during development of acute arthritis in the knee joint of the cat: a study with antibody microprobes. Brain Research 1990; 529: 214-23.

Schedlowski M, Flüge T, Richter S, Tewes U, Schmidt RE, Wagner TO. Beta-endorphin, but not substance-P, is increased by acute stress in humans. Psychoneuroendocrinology 1995; 20: 103-10.

Schmidt HD, Shelton RC, Duman RS. Functional biomarkers of depression: diagnosis, treatment, and pathophysiology. Neuropsychopharmacology 2011; 36: 2375-94.

Scholler D, Zablotski Y, May A. Evaluation of Substance P as a New Stress Parameter in Horses in a Stress Model Involving Four Different Stress Levels. Animals 2023; 13: 1142.

Scholz H. Stoffwechselkontrolle in der Milchkuhherde an Hand von Blut und Milchparametern. Praktischer Tierarzt 1990; 72: 32-5.

Selye H. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. Nature 1936; 138: 32.

Selye H. Confusion and Controversy in the Stress Field. Journal of Human Stress 1975; 1: 37-44.

Shaikh MB, Steinberg A, Siegel A. Evidence that substance P is utilized in medial amygdaloid facilitation of defensive rage behavior in the cat. Brain Research 1993; 625: 283-94.

Shepley E, Berthelot M, Vasseur E. Validation of the Ability of a 3D Pedometer to Accurately Determine the Number of Steps Taken by Dairy Cows When Housed in Tie-Stalls. Agriculture 2017; 7: 53.

Shirayama Y, Mitsushio H, Takashima M, Ichikawa H, Takahashi K. Reduction of substance P after chronic antidepressants treatment in the striatum, substantia nigra and amygdala of the rat. Brain Research 1996; 739: 70-8.

Slingsby L, Waterman-Pearson A. Comparison of pethidine, buprenorphine and ketoprofen for postoperative analgesia after ovariohysterectomy in the cat. Veterinary Record 1998; 143: 185-9.

Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, Mapplebeck JC, Wei P, Zhan S, Zhang S, McDougall JJ, King OD, Mogil JS. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. Molecular Pain 2011; 7: 55.

Stafford KJ, Mellor DJ. The welfare significance of the castration of cattle: a review. New Zealand Veterinary Journal 2005; 53: 271-8.

Stalder T, Kirschbaum C. Analysis of cortisol in hair–state of the art and future directions. Brain, Behavior, and Immunity 2012; 26: 1019-29.

Stilwell G, Lima MS, Broom DM. Comparing plasma cortisol and behaviour of calves dehorned with caustic paste after non-steroidal-anti-inflammatory analgesia. Livestock Science 2008; 119: 63-9.

Stilwell G, Carvalho RC, Carolino N, Lima MS, Broom DM. Effect of hot-iron disbudding on behaviour and plasma cortisol of calves sedated with xylazine. Research in Veterinary Science 2010; 88: 188-93.

Stock ML, Millman ST, Barth LA, Van Engen NK, Hsu WH, Wang C, Gehring R, Parsons RL, Coetzee JF. The effects of firocoxib on cautery disbudding pain and stress responses in preweaned dairy calves. Journal of Dairy Science 2015; 98: 6058-69.

Stock ML, Barth LA, Van Engen NK, Millman ST, Gehring R, Wang C, Voris EA, Wulf LW, Labeur L, Hsu WH, Coetzee JF. Impact of carprofen administration on stress and nociception responses of calves to cautery dehorning. Journal of Animal Science 2016; 94: 542-55.

Sutherland M, Lowe G, Huddart F, Waas J, Stewart M. Measurement of dairy calf behavior prior to onset of clinical disease and in response to disbudding using automated calf feeders and accelerometers. Journal of Dairy Science 2018; 101: 8208-16.

Svensson C, Lundborg K, Emanuelson U, Olsson S-O. Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectious diseases. Preventive Veterinary Medicine 2003; 58: 179-97.

Svensson C, Liberg P. The effect of group size on health and growth rate of Swedish dairy calves housed in pens with automatic milk-feeders. Preventive Veterinary Medicine 2006; 73: 43-53.

Tagawa M, Okano S, Sako T. Effect of change in body position on cardiopulmonary function and plasma cortisol in cattle. Journal of Veterinary Medical Science 1994; 56: 131-4.

Tan SY, Yip A. Hans Selye (1907-1982): Founder of the stress theory. Singapore Medical Journal 2018; 59: 170-1.

Taylor PM, Houlton JEF. Post-operative analgesia in the dog: a comparison of morphine, buprenorphine and pentazocine. Journal of Small Animal Practice 1984; 25: 437-51.

Theurer ME, White BJ, Coetzee JF, Edwards LN, Mosher RA, Cull CA. Assessment of behavioral changes associated with oral meloxicam administration at time of dehorning in calves using a remote triangulation device and accelerometers. BMC Veterinary Research 2012; 8: 48.

Theurer ME, Amrine DE, White BJ. Remote noninvasive assessment of pain and health status in cattle. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 2013; 29: 59-74.

Thom EC. The Discomfort Index. Weatherwise 1959; 12: 57-61.

Tometten M, Klapp BF, Joachim R, Fest S, Zenclussen AC, Peters EM, Hertwig K, Arck PC. Nerve growth factor and its functional receptor TrkA are up-regulated in murine decidual tissue of stress-triggered and substance P-mediated abortion. American Journal of Reproductive Immunology 2004; 51: 86-93.

Toyoda M, Nakamura M, Makino T, Hino T, Kagoura M, Morohashi M. Nerve growth factor and substance P are useful plasma markers of disease activity in atopic dermatitis. British Journal of Dermatology 2002; 147: 71-9.

Tregear GW, Niall HD, Potts JT, Jr., Leeman SE, Chang MM. Synthesis of substance P. Nature: New Biology 1971; 232: 87-9.

Tschoner T, Behrend-Wippermann M, Rieger A, Metzner M, Knubben-Schweizer G, Reichmann F, Feist M. Course of plasma substance P concentrations during umbilical surgery in calves. Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift 2018; 131: 522-8.

Tschoner T, Zablotski Y, Knubben-Schweizer G, Feist M. Effect of xylazine administration before laparoscopic abomasopexy to correct left displaced abomasum on markers of stress in dairy cows. Journal of Dairy Science 2020a; 103: 9318-31.

Tschoner T, Sauter-Louis C, Peinhofer V, Feist M. Attitudes of Bavarian bovine veterinarians towards pain and pain management in cattle. Veterinary Record 2020b; 187: 90.

Tschoner T. Methods for Pain Assessment in Calves and Their Use for the Evaluation of Pain during Different Procedures-A Review. Animals (Basel) 2021; 11: 1235.

Tschoner T, Feist M. Substance P concentrations in the blood plasma and serum of adult cattle and calves during different painful procedures and conditions - a systematic review. BMC Veterinary Research 2022; 18: 232.

Tschoner T, Mueller KR, Zablotski Y, Feist M. Pain Assessment in Cattle by Use of Numerical Rating and Visual Analogue Scales-A Systematic Review and Meta-Analysis. Animals 2024; 14: 351.

Tschoner T, Kerber H, Zablotski Y, Knubben-Schweizer G, Feist M (unpublished) Plasma substance P, cortisol, and glucose concentrations, and behavioral changes in healthy German Simmental calves undergoing an electrical pain stimulation. Submitted for Publication at Research in Veterinary Science; under Review.

Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. Journal of Psychosomatic Research 2002; 53: 865-71.

Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. Nature reviews neuroscience 2009; 10: 397-409.

Unger T, Carolus S, Demmert G, Ganten D, Lang RE, Maser-Gluth C, Steinberg H, Veelken R. Substance P induces a cardiovascular defense reaction in the rat: pharmacological characterization. Circulation Research 1988; 63: 812-20.

Vachon-Presseau E. Effects of stress on the corticolimbic system: implications for chronic pain. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 2018; 87: 216-23.

Van Engen NK, Stock ML, Engelken T, Vann RC, Wulf LW, Karriker LA, Busby WD, Lakritz J, Carpenter AJ, Bradford BJ, Hsu WH, Wang C, Coetzee JF. Impact of oral meloxicam on circulating physiological biomarkers of stress and inflammation in beef steers after long-distance transportation. Journal of Animal Science 2014; 92: 498-510.

Van Engen NK, Engelken TJ, Lockard CG, Lakritz J, Cernicchiaro N, Wilson BK, Krehbiel CR, Coetzee JF. The effects of pretransportation or arrival meloxicam administration to calves entering the feedlot on morbidity, biomarkers, performance, and carcass characteristics. Translational Animal Science 2019; 3: 620-32.

Van Reenen CG, O'Connell NE, Van der Werf JT, Korte SM, Hopster H, Jones RB, Blokhuis HJ. Responses of calves to acute stress: individual consistency and relations between behavioral and physiological measures. Physiology and Behavior 2005; 85: 557-70.

von Dawans B, Heinrichs M. Physiologische Stressreaktionen. In: Handbuch Stressregulation und Sport. Fuchs R, Gerber M, eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2018: 67-78.

Wadsworth ME, Broderick AV, Loughlin-Presnal JE, Bendezu JJ, Joos CM, Ahlkvist JA, Perzow SED, McDonald A. Co-activation of SAM and HPA responses to acute stress: A review of the literature and test of differential associations with preadolescents' internalizing and externalizing. Developmental Psychobiology 2019; 61: 1079-93.

Waiblinger S, Menke C, Fölsch DW. Influences on the avoidance and approach behaviour of dairy cows towards humans on 35 farms. Applied Animal Behaviour Science 2003; 84: 23-39.

Waterman A, Kalthum W. Use of opioids in providing postoperative analgesia in the dog: a double-blind trial of pethidine, pentazocine, buprenorphine, and butorphanol. In: Animal Pain: 1992: 466-79.

Weary D, Niel L, Flower F, Fraser D. Identifying and preventing pain in animals. Applied Animal Behaviour Science 2006; 100.

Wheelock JB, Rhoads RP, VanBaale MJ, Sanders SR, Baumgard LH. Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. Journal of Dairy Science 2010; 93: 644-55.

White BJ, Coetzee JF, Renter DG, Babcock AH, Thomson DU, Andresen D. Evaluation of two-dimensional accelerometers to monitor behavior of beef calves after castration. American Journal of Veterinary Research 2008; 69: 1005-12.

White BJ, Anderson DE, DuCharme A, Miesner MD, Larson RL, Amrine D. Multimodal assessment of biometric changes in injection sites and physiology and behavior in beef calves receiving two different clostridial immunizations compared to negative controls. International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine 2013; 11: 46-55.

Whitlock BK, Coffman EA, Coetzee JF, Daniel JA. Electroejaculation increased vocalization and plasma concentrations of cortisol and progesterone, but not substance P, in beef bulls. Theriogenology 2012; 78: 737-46.

Wiech K, Tracey I. The influence of negative emotions on pain: Behavioral effects and neural mechanisms. Neuroimage 2009; 47: 987-94.

Wikman I, Hokkanen A-H, Pastell M, Kauppinen T, Valros A, Hänninen L. Dairy producer attitudes to pain in cattle in relation to disbudding calves. Journal of Dairy Science 2013; 96: 6894-903.

Williamson A, Hoggart B. Pain: a review of three commonly used pain rating scales. Journal of Clinical Nursing 2005; 14: 798-804.

Winder CB, LeBlanc SJ, Haley DB, Lissemore KD, Godkin MA, Duffield TF. Clinical trial of local anesthetic protocols for acute pain associated with caustic paste disbudding in dairy calves. Journal of Dairy Science 2017; 100: 6429-41.

Winder CB, Miltenburg CL, Sargeant JM, LeBlanc SJ, Haley DB, Lissemore KD, Godkin MA, Duffield TF. Effects of local anesthetic or systemic analgesia on pain associated with cautery disbudding in calves: A systematic review and meta-analysis. Journal of Dairy Science 2018; 101: 5411-27.

Xu GY, Huang LY, Zhao ZQ. Activation of silent mechanoreceptive cat C and Adelta sensory neurons and their substance P expression following peripheral inflammation. Journal of Physiology 2000; 528 Pt 2: 339-48.

Yoon JS, Park J, Song R, Yu D. Substance P as a potential biomarker of pain assessment in dogs. Iranian journal of veterinary research 2019; 20: 289-92.

Zavy MT, Juniewicz PE, Phillips WA, VonTungeln DL. Effect of initial restraint, weaning, and transport stress on baseline and ACTH-stimulated cortisol responses in beef calves of different genotypes. American Journal of Veterinary Research 1992; 53: 551-7.

IX. DANKSAGUNG

Meine größte Dankbarkeit möchte ich, allen voran, an meine Betreuerin Frau Dr. Theresa Tschoner-Utza richten. Liebe Theresa, egal ob als Ratgeberin, als blitzschnelle Lektorin und vor allem als motivierte Fremdenführerin durch die verschlungenen Wege einer Dissertation - ich konnte wirklich IMMER auf dich zählen und bin mir dieses Privilegs bewusst. Trotz deinem Spagat zwischen Arbeit und Familie schaffst du es alles unter einen Hut zu bringen, wovor ich ungeheuren Respekt empfinde.

Ein herzlicher Dank gebührt auch meiner Doktormutter Frau Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer. Ihre aufbauenden Worte in den Doktorand*innen-Seminaren und die regelmäßige Unterstützung haben das Vorankommen stets erleichtert. Weiters möchte ich mich bei Frau Dr. Feist bedanken, die trotz dutzender Verpflichtungen ein prüfendes Auge für diese Arbeit übrig hatte und stets um mein eigenes und das Wohlergehen der Versuchskälber bemüht war.

Weiters darf das Pfleger*innenteam rund um Markus Reimann (insbesondere Anna, Niklas, Elli, Killian, Thorsten und natürlich Markus) bei dieser Danksagung keinesfalls fehlen. Trotz Personalmangels und fehlendem Pfleger*innennachwuchs wurden „meine Pappenheimer“ nie vernachlässigt und tagtäglich unter Mehraufwand von euch ver- und umsorgt. In diesem Zuge auch ein herzliches Dankeschön an alle Tierärzt*innen, denen die undankbare Aufgabe des „Kälbersittings am Wochenende“ regelmäßig zu Teil wurde. Danke auch an Hias für die erfolgreichen Ausflüge zum Kälbermarkt (Zitat Theresa: „Im Zweifel - hör auf den Hias, der kennt sich da aus“), die wir oft mit der ein oder anderen Leberkässemmel ausklingen ließen.

Ein weiterer Dank gebührt dem Laborteam der Klinik unter der Leitung von Dr. Frank Weber und Sandra Kirsch. Vielen lieben Dank für den Service des schrittintensiven Probenabholens - egal ob bei strömendem Regen oder klirrender Kälte - auf euch war Verlass.

Bedanken möchte ich mich auch bei unserem Statistiker Dr. Yury Zablotski, bei dem ich immer wieder staunte, wieviel man aus Zahlen herausholen kann, wenn man sich tagtäglich damit beschäftigt. Diese Fähigkeit kam schlussendlich auch der

statistischen Auswertung dieser Arbeit zugute, wofür ich Yury sehr verbunden bin.

Nicht zuletzt will ich auch dem limitierenden Faktor und zugleich dem wichtigsten Gut dieser Studie danken – meinen Versuchskälbern. Versuche an lebenden Tieren sind heikel und manchmal nicht vorhersehbar, umso glücklicher war ich über meine Kälber, die alles so brav mitgemacht haben – ich hoffe ich habe euch nicht zu sehr gestresst.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, ohne die schon allein das Studium nicht möglich gewesen wäre. Egal ob ein Internat in der Steiermark, eine Kunst-Uni in Bozen oder schließlich das Tiermedizin-Studium in München - ihr habt alles im gleichen Maße unterstützt, wofür ich euch unendlich dankbar bin.

Zu guter Letzt möchte ich meinem Freund Marius und meiner Hündin Lovi danken, die mich auch bei langen Durststrecken aushalten „durften“. Aber egal, ob nach langen Versuchstagen und/oder stressigen Diensten, die beiden verstanden es immer wieder mich aufzuheitern. Sei es durch einen Kuss auf die Stirn, oder einen feuchten Waschlappen quer durch´s Gesicht.