

Reaktionsmuster von Tieren auf gewohnte und ungewohnte Ereignisse.

Cortisol im Blutplasma und Speichel von Kälbern im Alter von 60 Lebenstagen bei Nahrungsaufnahme, Transport und temporärer Separation

MARTIN STEINHARDT und HANS-HERMANN THIELSCHER

Institut für Tierzucht und Tierverhalten Mariensee,
 Institutsteil Trenthorst/Wulmenau

Im Produktionsprozeß notwendige Manipulationen an Tieren bestehen aus einigen Hauptkomponenten und sind mit einer Folge von Ereignissen (Annäherung des Menschen an das Tier, Fangen, Fixieren, Entfernen aus sozialer Umgebung, temporäre Separation, Transport, neue Umgebung) verbunden, die beim Tier Erregungs- und Aktivitätszustände auslösen und biorhythmische Funktionsabläufe sowie Stoffverteilungen und -umsätze ändern.

Die Cortisolkonzentration im Blutplasma ist bei Kälbern in Verbindung mit Belastungszuständen untersucht und als Ausdruck der Aktivierung des Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren(HHN)-systems gewertet worden (Crookshank et al., 1979; Fell u. Shutt, 1986; Locatelli et al.,1989; Molony et al., 1995; Steinhardt und Thielscher, 1998; Trunkfield u. Broom, 1990; Trunkfield et al., 1991). Einschätzungen der Reaktivität des Systems und des Reaktionsgrades sind mit Hilfe von Stimulierungen durch ACTH-Applikation möglich (Steffen, 1989; Kamimura et al., 1987; Lay et al., 1992; Zavy et al., 1992) und Beeinflussungen derselben nach Transportbelastung (Kamimura et al.,1987) deutlich geworden. Methodische Probleme der sogenannten stressfreien Blutprobengewinnung führten u. a. zur Verwendung von Speichelproben und zur Nutzung der Speichelcortisolkonzentration, die bei Kälbern wenig untersucht worden ist (Fell u. Shutt, 1984;1986; Trunkfield u. Broom, 1990; Trunkfield et al., 1991). Angaben über die Beziehungen zwischen den Cortisolkonzentrationen im Blutplasma und Speichel bei Kälbern in verschiedenen Funktionszuständen liegen anscheinend nicht vor. Die vorliegende Arbeit bezieht sich auf ein Datenmaterial aus mehreren Projekten und untersucht bei weitgehend einheitlichem Vorgehen und bei Berücksichtigung der Zeitbeziehungen Reaktionsformen von Kälbern auf Ereignisse, die mit unterschiedlichen Erregungs- und Aktivitätszuständen verbunden sein können, berücksichtigt neben Haltungsverarianten insbesondere individu-

elle Reaktionsgrade sowie die Beziehung zwischen Cortisol im Blut und im Speichel.

Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an Tränkkälbern (TK) der Milchrindherde (Deutsche Holstein Friesian, DHF) und an Saugkälbern (SK) der Mutterkuhherde (Deutsche Rotbunte, DRB) des Institutes während der Wintermonate und in der Tageszeit zwischen 08.30 Uhr und 11.00 Uhr vorgenommen (Tabelle 1). TK wurden in Gruppenboxen mit Tränkeautomatenfütterung aufgezogen und erhielten Milchaustauscher, Pellets, Heu und Silage.

Bei einheitlichen Vorgehensweisen im Umgang mit den Tieren und exakter Protokollierung der Untersuchungszeitpunkte wurden Untersuchungen an Kälbergruppen vor und nach Milchaustauscheraufnahme, standardisierter Transportbelastung und temporärer Separation vorgenommen. Wichtige Bedingungen der Untersuchungen sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Transportbelastungen wurden in standardisierter Form vorgenommen (Steinhardt u. Thielscher, 1998), um den Charakter eines Testes für ein im Produktionsprozeß häufig notwendiges Ereignis zu gewährleisten.

Tabelle 1: Tiermaterial und Untersuchungsablauf

	Anzahl	Geschlecht	Rasse	Alter (d)	Untersuchung vor	Ereignis	Untersuchung nach
Milchaustauscher	32	m 16 w 16	DHF	64±3	Gruppenbox 20 Tiere letzter Abruf 20.00 Uhr 7.30 Uhr Einzelboxen 7.45 Uhr Blut, Speichel Meßgeräte	2 l Milchaustauscher Nuckeleimer	Einzelboxen 20 min nach Beendigung der Tränke Blut, Speichel Meßgeräte
Transport	30	m 14 w 16	DHF	60±3	Gruppenbox 20 Tiere 7.45-8.15 Uhr Blut, Speichel Meßgeräte	Verladen, 20 min Stehen 20 min Fahrt Entladen	Vorhalle Blut, Speichel Meßgeräte
Separation	18	m 13 w 5	DRB	66±6	Laufstall Fangen am Halsgurt, Strickhalter anlegen, Fixieren vor d. Stallgebäude Blut, Speichel Meßgeräte	Transport 3,5 km Isolierraum 4x3x2,55 m künstliche Lichtquelle, 60...90 min	Isolierraum Blut, Speichel Meßgeräte

Blutproben wurden durch Punktion aus der *Vena jugularis* entnommen, Speichelproben mit Hilfe eines Tampons. Blut- und Speichelproben wurden unverzüglich im Labor in üblicher Weise aufgearbeitet. Cortisol wurde im Blutplasma und im Speichel mit Hilfe eines Radioimmunoassay bestimmt.

Zur Gewinnung des Speichels werden gebräuchliche Tampons mit starkem Aufsaugvermögen durch die seitliche Lippenspalte in die Mundhöhle der Tiere gebracht und an dem Faden zwischen Daumen und Zeigefinger festgehalten. Bei einigen Tieren mußte mit Hilfe des Zeigefingers ein Herauswerfen des Tampons verhindert werden. Nach 1 bis 3 min wurden die Tampons in ein 100 ml-Zentrifugenröhrchen aus Polycarbonat (No. 9315340 von Fisher Scientific, 98 x 45 mm Rundboden), präpariert mit einem Glasstopfen mit breitem Rand ca. 30 mm Durchmesser, gegeben und bei 3000 U/min (RZB 2807 x g) und 4-8 °C zentrifugiert. Der Stopfen hält den Tampon von dem Boden des Röhrchens entfernt. Nach Zentrifugation werden Tampon und Glasstopfen aus dem Röhrchen entfernt, 500 µl Speichel abgenommen und sofort der weiteren Verarbeitung unterzogen oder bei -100°C gefroren und lyophilisiert. 500 µl Speichel oder das lyophilisierte Produkt werden mit 500 µl H₂O aufgenommen und mit 2 ml Dichlormethan versetzt, 5 min bei 300 U/min auf einem horizontalen Schüttler (Fa. Braun) geschüttelt. Nach Extraktion wird 10 min zentrifugiert bei 3000 U/min und 4-8 °C. Die getrennten Phasen werden separiert und 600 µl Dichlormethanphase zur Cortisolbestimmung zugeführt. Nach Verdunstung im Vakuumtrockenschrank mit Absaug- und Kühlvorrichtung werden die Proben in einem Radioimmunoassay bearbeitet.

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der Regressions- und Korrelationsrechnung sowie Varianzanalyse bearbeitet (PC-Statistik von Topsoft Hannover). Mittelwerte zweier Stichproben wurden mit dem t-Test geprüft. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten sind in den Tabellen angegeben.

Tabelle 2: Cortisol im Blutplasma und Speichel von Kälbern im Alter von 60 LT vor und nach Milchaustauscheraufnahme, Transport und Separation, Statistiken

	Plasmacortisol (ng/dl)			Speichelcortisol (ng/ml)		
	vor	nach	Differenz	vor	nach	Differenz
Milchaustauscher (Tränkkälber)						
n	31	31	31	31	31	29
x	4,12	1,469 ^a	-2,62	0,802 ^a	0,589 ^a	-0,198
s	2,857	0,775	2,668	0,49	0,6	0,683
min	0,08	0,48	-7,67	0,24	0,01	-1,71
max	10,17	3,2	1,51	2,2	2,73	2,02
Transport (Tränkkälber)						
n	27	30	27	26	26	21
x	4,32	32,44 ^{a,b}	29,11	0,485 ^b	2,133 ^{a,b}	1,903
s	3,17	11,92	11,93	0,335	1,282	1,269
min	0,3	11,6	4	0,07	0,05	-0,16
max	12,1	56,8	52,4	1,58	6,34	5,68
Separation (Saugkälber)						
n	18	18	18	16	16	15
x	2,795	8,248 ^{a,c}	5,453	0,545 ^b	0,647 ^a	0,099
s	3,777	6,873	8,583	0,383	0,374	0,504
min	0,01	0,01	-12,94	0,192	0,171	-1,029
max	12,95	24,39	23,6	1,447	1,436	0,829

* Mittelwerte vor und nach signifikant verschieden
a,b,c Mittelwerte in der Säule mit gleichen Buchstaben nicht signifikant verschieden

Tabelle 3: Korrelationen und Regressionen der Änderung der Cortisolkonzentration im Blutplasma und Speichel mit der Cortisolkonzentration vor (Cortisol 0) und derjenigen nach (Cortisol 1) dem Ereignis

	Plasma		Speichel	
	DI Cortisol : Cortisol 0	DI Cortisol : Cortisol 1	DI Cortisol : Cortisol 0	DI Cortisol : Cortisol 1
Milchaustauscher (Tränkkälber)	N 31, r = -0,964 p < 0,0001 y = -0,9x + 1,09	N 31, --	N 29, r = -0,492 p = 0,0035 y = -0,67x + 0,34	N 29, r = 0,704 p < 0,0001 y = 0,78x - 0,67
Transport (Tränkkälber)	N 27, --	N 27, r = 0,966 p < 0,0001 y = 0,95x - 0,26	N 21, --	N 21, r = 0,964 p < 0,0001 y = 1,0x - 0,48
Separation (Saugkälber)	N 18, r = -0,628 p = 0,0029 y = -1,43x + 9,44	N 18, r = 0,904 p < 0,0001 y = 1,13x - 3,86	N 15, r = -0,666 p = 0,0033 y = -0,87x + 0,59	N 15, r = 0,647 p = 0,0045 y = 0,86x - 0,47

Ergebnisse

Statistiken für die Kälbergruppen mit Flüssignahrungsaufnahme, Transport und Separation (**Tabelle 2**)

Die Ausgangswerte der Plasmacortisolkonzentration sind bei den Tiergruppen nicht unterschiedlich. Bemerkenswert ist die große Streuung, besonders bei den Saugkälbern. Die Änderungen der Mittelwerte von Plasmacortisol sind signifikant, und zwar nach Nahrungsaufnahme verringert und nach Transport und Separation vergrößert. Bemerkenswert ist eine größere Variation der Werte an allen Untersuchungspunkten und insbesondere auch der Differenz der Untersuchungsbefunde nach gegenüber vor dem Ereignis. Die Ausgangswerte der Speichelcortisolkonzentration sind bei Tränkkälbern vor der Nahrungsaufnahme signifikant größer als bei den Kälbern der beiden übrigen Gruppen. Die Änderungen der Mittelwerte der Speichelcortisolkonzentration

tration nach dem Ereignis sind in der Richtung so wie jene der Plasmacortisolkonzentration, gesichert sind sie jedoch nur nach der Transportbelastung. Bemerkenswert ist hier ebenfalls die große Streuung.

Korrelationen und Regressionen der Variablen zwischen den Untersuchungen

Die Plasmacortisol- und Speichelcortisolkonzentrationen vor gegenüber nach dem Ereignis sind bei den Tiergruppen geprüft worden. Sichere Korrelationen und Regressionen konnten nicht gefunden werden.

Korrelationen und Regressionen der Änderungen der Variablen mit den Ausgangswerten

An **Tabelle 3** und den **Abbildungen 1 und 2** sind die Beziehungen der Änderungen der Cortisolkonzentration im Plasma und Speichel gegenüber den Ausgangswerten und gegenüber den Werten nach dem Ereignis zu erkennen. Bei Milchaustauscheraufnahme wird die Änderung der Plasmacortisolkonzentration von den Ausgangswerten und diejenige der Speichelcortisolkonzentration in höherem Maße von den Werten nach dem Ereignis bestimmt (**Abb. 1**). Bei Transportbelastung wird die Änderung der Cortisolkonzentration im Plasma und Speichel von den Werten nach dem Ereignis bestimmt (**Abb. 2**). Bei Separation der Saugkälber wird die Änderung der Cortisolkonzentration im Plasma und Speichel sowohl von den Ausgangswerten als auch von den Werten nach dem Ereignis bestimmt (**Tab. 3**).

Korrelationen und Regressionen von Plasmacortisol und Speichelcortisol in den Untersuchungen

Beziehungen zwischen Plasma- und Speichelcortisolkonzentration sowie zwischen deren Änderungen bei Kälbern vor und nach dem Ereignis sind geprüft worden, sichere Korrelationen konnten bei Milchaustauscheraufnahme und Transport nicht, bei Separation der Saugkälber jedoch zwischen den Änderungen von Plasma- und Speichelcortisolkonzentration nachgewiesen werden ($n = 15, r = 0,708, p = 0,0016, y = 0,044x - 0,105$).

Diskussion

Die Änderungen der Cortisolkonzentration im Blutplasma und Speichel bei gewohnten und ungewohnten Ereignissen sind von der Ausgangssituation abhängig und können daher stärker durch die Konzentrationen vor, durch jene nach einem Ereignis oder durch beide in annähernd gleichem Maße bestimmt werden (**Tabelle 3**). Die Untersuchungen

lassen die Bedeutung zeitlicher Beziehungen der Auslösung und der Stärke der Reaktionen für die individuellen Änderungen der Meßgrößen durch die Ereignisse deutlich werden. Die Reaktivität des HHN-Systems, die Qualität der Cortisoldisposition und die Dynamik der Konzentrationsänderungen sind in einem Zusammenhang zu sehen, wenn Beziehungen zum Belastungsgrad eingeschätzt werden sollen. Ort und Art des Eintritts der Stoffe in den Blutkreislauf, vom spezifischen Organdurchblutungsgrad und von der Kreislaufzeit abhängige Verteilungsgeschwindigkeit und damit Kinetik der Konzentration im zentralen Kreislauf und die Geschwindigkeit der Blutprobenentnahme sind von Einfluß auf die Änderungen der Meßgrößen. Bei Belastungen von Tieren ist vorwiegend die Aktivierung des HHN-Systems von Interesse gewesen, wobei die Konzentrationszunahme von Cortisol als Ausdruck von Stress und

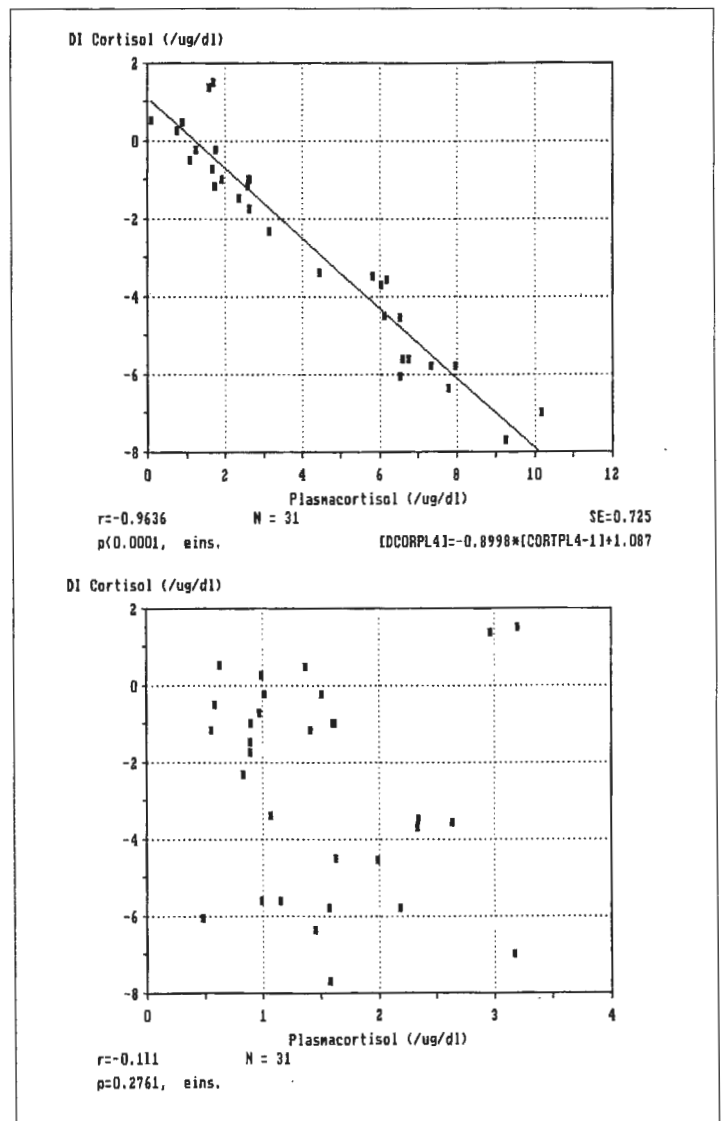


Abbildung 1: Beziehung zwischen der Änderung von Plasmacortisol (DI Cortisol) nach Milchaustauscheraufnahme und den Ausgangswerten (oberer Teil) und den Werten nach dem Ereignis (unterer Teil), Einzelwerte und Regressionsgrade

Unwohlsein gewertet worden ist. Kritisch betrachtet wurde die Blutprobengewinnung durch Venenpunktion, da diese mit zusätzlichen und unerwünschten Reaktionen verbunden sein könnte. Als „stressfrei“ bezeichnete Blutprobenahmen mit Hilfe von Kathetern und Pumpen wurden genutzt (Ladewig und Stribny, 1988), um die episodische Freigabe des Cortisols aus der Nebenniere von Rindern und Schweinen zu charakterisieren. Die Ansammlung kleinster Blutmengen über Zeiträume von etwa 20 min ist hier mit einem Egalisierungseffekt verbunden. Vor- und Nachteile des methodischen Vorgehens und der technischen Hilfsmittel sind in engem Zusammenhang mit den zu lösenden Fragestellungen zu sehen. Die sogenannte stressfreie Blutentnahme mit Hilfe von Kathetern im Gegensatz zur Venenpunktion in Verbindung mit der Reaktivität des HHN-Systems ist aus mehreren Gründen kritisch zu betrachten, da die wirklichen Blutentnahmepunkte im Blutkreislauf in den meisten Fällen nicht sicher identifiziert, die Zeitbeziehungen zwischen Auslösung der Erregung und der Freisetzung der Steroide aus der NN und deren Verteilung im Kreislaufsystem von Bedeutung sind und eine wichtige Komponente des Erregungseffektes mit der Annäherung von Personen an das Tier und der Wahrnehmung von Personen in der Nähe des Tieres verbunden ist. Darüber hinaus ist der Katheter ein Fremdkörper im Blutkreislaufsystem, welcher immunendokrinologische Reaktionen auslöst.

Die individuelle Erregbarkeit, die Individualspezifität physiologischer Variablen und der Reaktionen sind in Verbindung mit dem Verhaltensphänotyp unter dem Gesichtspunkt von Temperament oder Typ (Reaktionstyp) oder auch sozialem Rang (dominant, subordiniert) und in Verbindung mit Leistungsmerkmalen und dem Adaptationsvermögen der Tiere von Interesse. Für Meßgrößen des neurohumoralen Systems sind bei Labortieren (Taylor et al., 1989; Sgoifo et al., 1996) und beim Menschen (Adler et al., 1997; Gerra et al., 1998; Gunnar et al., 1997) solche Zusammenhänge nachgewiesen worden.

Die Annäherung und Duldung von Menschen in der Nähe eines Tieres scheint von größerer Bedeutung für die Aktivierung von Funktionssystemen, speziell derjenigen integrativer Systeme zu sein, wie durch neuere unveröffentlichte Untersuchungsbefunde verdeutlicht wird. Tiere sind mit einem sicheren Signalsystem (akustisch, visuell, olfaktorisch) ausgestattet, welches bei geringsten Veränderungen in der Umwelt die Aufmerksamkeit erhöht und die Informationsaufnahme auf die Erscheinung ausrichtet. Dieses Sicherungssystem funktioniert auch noch dann, wenn z. B. ein Kanal wie die visuelle Informationsaufnahme eingeschränkt oder weitgehend ausgeschaltet ist.

In der vorliegenden Arbeit sind Erregungssteigerungen bei Kälbern aus zwei Aufzuchtvarianten in gewohnten und ungewohnten Umgebungen und Situationen bei weitgehend einheitlichem Vorgehen veranlaßt worden, die die

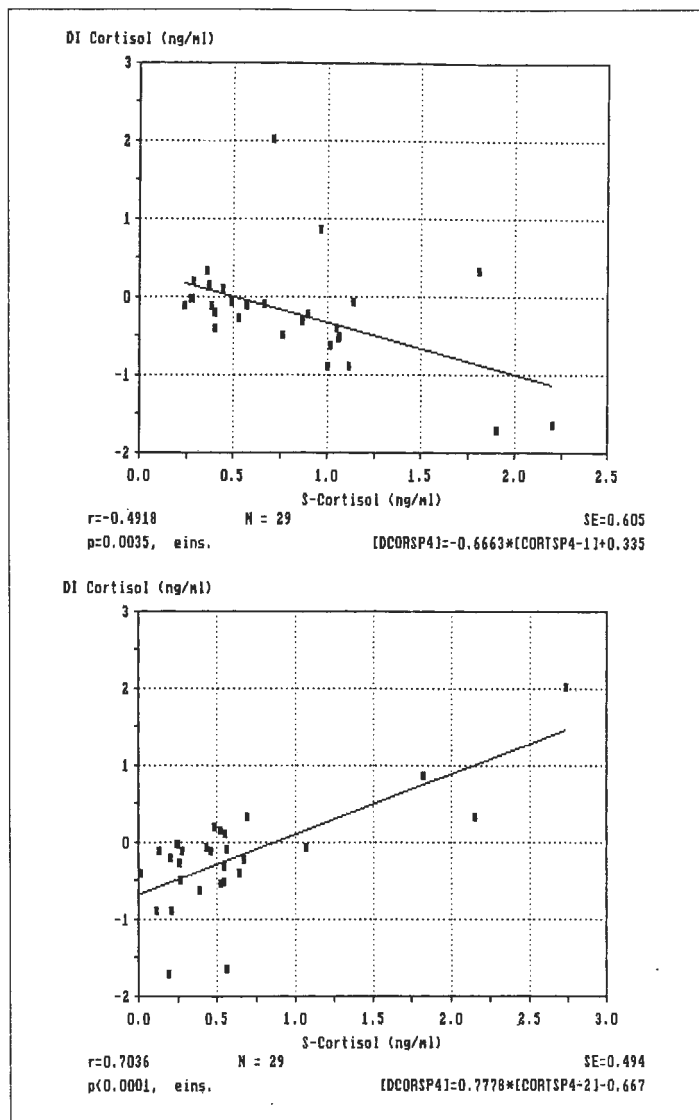


Abbildung 2: Beziehung zwischen der Änderung von Speichelcortisol (DI Cortisol) nach Milchaustauscheraufnahme und den Ausgangswerten (oberer Teil) und den Werten nach dem Ereignis (unterer Teil), Einzelwerte und Regressionsgrade

Bedeutung des Kontextes, der Entwicklungsbedingungen, des Adaptationszustandes und des funktionellen Status der Kälber für die Reaktivität des HHN-Systems und die Qualität der Cortisol disposition deutlich werden lassen. Die Tiere aller Gruppen sind die Vorgehensweise und die Untersuchungsabläufe infolge zwei- bis dreimaliger Wiederholung gewohnt gewesen. Einflüsse des Alters auf die Reaktivität des HHN-Systems sind bekannt, werden bei den vorliegenden Untersuchungen nicht von vorrangigem Einfluß sein, da sie an Tieren in einem engen Altersbereich vorgenommen worden sind.

Bemerkenswert sind die unterschiedlichen Speichelcortisolkonzentrationen zwischen den Tiergruppen vor und nach den Ereignissen und die schwachen Beziehungen zwischen den Cortisolkonzentrationen im Blutplasma und Speichel,

die zur Folge haben, daß Mittelwertunterschiede an den Speichelkonzentrationen nur im Falle von stärkeren Reaktionen wie bei Transportbelastung zu sichern waren. Hohe Korrelationen der Konzentrationsänderungen mit den Konzentrationen des Cortisols vor und nach dem Ereignis deuten auf individuell unterschiedliche Cortisoldispositionen und Übergangsraten des freien Cortisols in den Speicheldrüsen hin. Dies wäre in weiteren Untersuchungen genauer zu prüfen.

Änderungen der Nebennierenrindenfunktion und der Kortikosteroiddisposition bei Nahrungsaufnahme der Kälber sind anscheinend wenig untersucht worden. Anstiege der Cortisolkonzentration des Menschen während des Mittagmahles sind bekannt (Svec und Shavar, 1997). Diese sind im Ausmaß unterschiedlich bei Gruppen nach dem Körperfettgehalt. Die Verringerung der Plasmacortisolkonzentration nach Milchaustauscheraufnahme kann mit einer Umstellung des sensorischen Inputs und einer weiteren Abnahme des Erregungsniveaus bei den Kälbern in Verbindung stehen. Verdauungs- und Resorptionsvorgänge beginnen sogleich nach Nahrungsaufnahme und nehmen etwa 20 bis 30 min danach stärker zu, wobei Umverteilungen des Blutstromes, Verlagerungen des Blutvolumens und auch der intravasalen Proteinmengen erfolgen.

Aktivierungen sympathischer nervaler Funktionen mit Hypertension und HF-Steigerung sind bei Jungtieren vieler Species während der Milchernährungsperiode auch bei Nahrungsaufnahme festgestellt worden (Bloom et al., 1975; Ermgassen, 1996; Grant et al., 1997; Langille et al., 1989; Scalzo, 1992). Sympathische Aktivierungen bei Nahrungsaufnahme bestehen nur für kurze Zeit und verschwinden beim Übergang in die Resorptions- und Verdauungsphase, die mit einer Blutflußumverteilung zu den Bauchorganen verbunden ist. Die zentralnervale catecholaminerge Kontrolle der ACTH-Sekretion ist bekannt (Takao et al., 1988), und bei älteren Kälbern sind Beziehungen zwischen sympathischer Aktivierung und Steroidhormonbildung und -freisetzung nachgewiesen worden (Edwards und Jones, 1993; Edwards, 1998).

Die Zunahme des Blutdruckes ist bei Kälbern besonders ausgeprägt, und sie ist mit einer schnell eintretenden HF-Steigerung verbunden. Die Reaktion ist nicht mit einer Freisetzung von Neuropeptid Y (NPY) verbunden (Bowman et al., 1997), wie sonst bei Stimulierung des N. *splanchnicus*. NPY reguliert in der Nebenniere die Tyrosinhydroxylasegenexpression und demzufolge die Katecholaminsynthese (Medeiros u. Turner, 1996).

Temporäre Separationen sind häufig bei Manipulationen an Tieren und speziell an Jungtieren im Produktionsprozeß. Erregungssteigerungen und Reaktionen bei Separation von Nutztieren wurden bisher wenig untersucht (Hausziegen: Lyons et al., 1988; Schafe, Ziegen: Lyons et al., 1993). Das HHN-System ist das am häufigsten untersuchte physiologische System in Studien sozialer Separation, daneben die Aktivierung des autonomen Systems (Hennessy, 1997). Reaktionsformen und -dauer bei separierten Tieren

hängen vom Bindungsgrad an den Sozialpartner (soziale und/oder parentale bzw. maternale Bindung) ab und haben daher einen strengen Zeitbezug hinsichtlich Alter und Adaptation des Tieres an spezifische Umgebungsbedingungen. Bei einem Alter von 60 Lebenstagen ist die maternale Bindung der Kälber stark, weist jedoch bei den Muttertier-Kalb-Paaren beträchtliche individuelle Unterschiede auf, wie in Verbindung mit den Wachstumsleistungen der Kälber aufgezeigt werden konnte (Steinhardt et al., 1995b,c). Obwohl die Plasmacortisolkonzentration im Mittel am Ende der Separation sicher erhöht war, waren die individuellen Reaktionen sehr unterschiedlich.

Poolgröße, Verteilungsvolumen und Halbwertszeit des Cortisols sind von Konzentration, Menge und Verteilung der Proteine und speziell des CBG und der Albumine abhängig, und es kann die Gesamtcortisolkonzentration im Blutplasma nicht in Beziehung zur Cortisolbildungsrate stehen, wenn CBG-Konzentration und -Menge sich ändern (Bright, 1995). Dies ist bei trächtigen Ratten (Waddell u. Atkinson, 1994), bei Pferden nach körperlichen Belastungen (Lassourd et al, 1996; Nogueira u. Barnabe, 1997) und nach sozialem Stress (Alexander u. Irvine, 1998) deutlich geworden. CBG kommt in verschiedenen Körpergeweben vor, und seine Konzentration im Blut wird durch viele Faktoren (Alter, Ernährung, Funktionszustand, Belastungsgrad und -dauer) beeinflusst und bei akuter Belastung ausreichender Intensität verringert (Ratten: Marti et al., 1997). Angaben zum CBG und zur Cortisoldisposition bei Nutztieren sind kaum vorhanden (Gayrard et al., 1996).

Freies Cortisol verläßt das Blutkreislaufsystem an mehreren Stellen wie Speicheldrüsen und Milchdrüsen (Verkork et al., 1998). Cortisol im Speichel beträgt beim Menschen 2,1 bis 3,5 % des Gesamtcortisols im Serum (Ardal u. Holm, 1995), 2,1 % bei Serumwerten <450 nmol/l und 3,0 % bei solchen >450 nmol/l und weist beim Menschen wie auch bei Schafen (Cook u. Jacobson, 1995), bei Meerschweinchen (Fenske, 1997) erhebliche individuelle Unterschiede auf. Serumkonzentrationen >450 nmol/l waren in den meisten Fällen von merklichem Anstieg der Speichelcortisolkonzentration begleitet. Die Korrelation zwischen Serum- und Speichelkonzentration beim Menschen betrug $r = 0,86$ für den ersten und $r = 0,44$ für den größeren Konzentrationsbereich (Ardal u. Holm, 1995). Bei Hunden beträgt Speichelcortisol 7,2 bis 11,9 % der Plasmacortisolkonzentrationen und die Korrelation $r = 0,93$ (Beerda et al., 1996) nach durch Hypoglycämie provozierte NN-Reaktion. Vergleichsweise mäßige, aber sichere Korrelationen wurden vor dieser Behandlung gefunden. In den vorliegenden Untersuchungen an Kälbern beträgt die Speichelcortisolkonzentration vor und nach Milchaustauscheraufnahme 20,0 und 40,1 %, vor und nach Transport 11,2 und 6,2 % und vor und nach Isolierung 19,1 und 7,8 % der Serumkonzentration. Angaben über den Korrelationsgrad von Plasma- und Speichelcortisolkonzentration sind unterschiedlich in Untersuchungen an verschiedenen Tierarten und bei unterschiedli-

chen Bedingungen. Ein Haupteffekt kann mit der Entwicklungsqualität und dem Alter der Tiere sowie mit dem Anfluten des Cortisols im Speichel in Verbindung stehen, was von mehreren Faktoren abhängig sein kann und bei Kälbern nicht untersucht worden ist. Kontaminationen durch Spuren von Blut und andere Cortisol enthaltende Stoffe sind nicht sicher auszuschließen.

Der Anteil des freien Cortisols ändert sich bei verschiedenen Produktionsraten und Konzentrationen des Cortisols im Blut (Aardal und Holm, 1995) und auch in Abhängigkeit von den chemisch-physikalischen Bedingungen (Haourigui et al., 1993; Obminski u. Stupnicki, 1996). Beträchtliche individuelle Variationen der Konzentration der Hauptproteine des Blutes und verringerte pH-Werte bei einem Anteil der Tiere infolge der Aktivitätssteigerungen sind bei ähnlicher Vorgehensweise festzustellen (Steinhardt et al., 1995a, 1996, 1997). Im Serum ist Cortisol zu 90 bis 95 % an Proteine gebunden. Im Speichel erscheint Cortisol hauptsächlich in der freien Form, unabhängig vom Speichelfluß sowie von der serösen oder mukösen Speichelqualität. Ein kleiner Teil kann an CBG gebunden sein, welches im Speichel enthalten sein kann. Durch Zusammenwirken zwischen sympathischer und parasympathischer Aktivität wird beim Kalb die Proteinsekretion der Speicheldrüsen gesteigert (Calvert et al., 1998). Der Übergang des freien Cortisols erfolgt durch freie Diffusion durch die Speicheldrüsenzellen hindurch, wobei sich Gleichgewichtszustände innerhalb weniger Minuten einstellen. Speichelcortisol ist etwa 70 % der freien Cortisolkonzentration des Serums wahrscheinlich infolge der Aktivität der 11-beta-hydroxysteroid-dehydrogenase in der Speicheldrüse.

Einflüsse auf die Speichelcortisolkonzentration durch das für die Speichelsammlung verwendete Material (Cook et al., 1997), unterschiedliche Aktivität der 11-hydroxysteroid-dehydrogenase (Cortisol/Cortison-Verhältnis im Speichel), Kontamination des Speichels mit Plasmaproteinen und mit Blut, Variation des Speichelcortisols innerhalb von Minuten.

Zusammenfassung

Milchrindkälber aus der Gruppenaufzucht mit Tränkeautomatenfütterung wurden vor und nach Milchaustauscheraufnahme (2 Liter) sowie vor und nach standardisierter Transportbelastung und Saugkälber der Mutterkuhhaltung vor und nach temporärer Separation untersucht. Cortisolkonzentrationen von Blutplasma und Speichel waren nach Flüssignahrungsaufnahme verringert und nach Transport sowie Separation erhöht, sichere Mittelwertdifferenzen gab es nur bei den Plasmacortisolwerten nach Transport auch bei den Speichelcortisolwerten. Änderungen der Cortisolkonzentrationen durch die Ereignisse sind von der Ausgangssituation abhängig und werden stärker durch die Konzentration vor als durch jene nach einem Ereignis oder durch beide in annähernd gleichem Maße bestimmt. Die individuellen Reaktionsgrade und Dispositionen des

Cortisols sind beträchtlich und beeinflussen Anfluten und Übergang des Cortisols in den Speichel, so daß größere Variationen zwischen den Untersuchungsbedingungen und auch bei einzelnen Tieren festgestellt werden konnten. Reaktivität des Hypothalamo-Hypophysen-Nebennierensystems, Qualität der Cortisoldisposition und die Dynamik der Konzentrationsänderungen sind in einem Zusammenhang zu sehen, wenn Beziehungen zum Belastungsgrad von Tieren eingeschätzt werden sollen.

Reaction patterns of animals to events they are or they are not familiarized with. Plasmacortisol and salivary cortisol in calves at 60 days life age feeding milk replacer, being transported or temporarily separated from their dams

Group reared dairy calves fed with milkreplacer by an automatic feeder were used in feeding and transport experiments and suckler calves from the mother cow herd were exposed to separation experiments. Dairy calves were kept single in crates at the morning of the experimental day having the last chance for feeding milkreplacer at 8.00 hour p. m. the day before. At around 8.00 hour a. m. these calves could feed 2 l milkreplacer. Dairy calves from another group were exposed to standardized transport procedure consisting of loading, remaining 20 min on the standing vehicle, around 20 min transport, unloading, lasting about one hour. Suckler calves were taken out of the barn, transported and kept single in an isolation room for one hour. Cortisol has been measured in plasma and saliva samples taken before and after the events. Mean cortisol concentration was diminished after feeding milk replacer and was increased after transportstress and temporary separation. Significantly elevated levels were found only after transportstress. There was great variation in plasma and saliva cortisol concentrations at all sampling points. Changes of plasma and saliva cortisol concentration showed strong negative correlations with the starting values and strong positive correlations with the measures after the separation experiments. Concentration measures of cortisol alone are not sufficient concerning hypothalamo-hypophyseal-adrenal system reactivity. Beside this cortisol disposition and dynamic changes of cortisol concentrations have to be considered in connection with the course of the separation procedure and the excitement of the animals.

Literatur

- Aardal, E. and A.-C. Holm (1995): Cortisol in saliva - reference ranges and relation to cortisol in serum. - Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 33, S. 927-932.
- Adler, L., D. Wedekind, J. Pilz, G. Weniger and G. Huether (1997): Endocrine correlates of personality traits: a comparison between emotionally stable and emotionally labile healthy young men. - Neuropsychobiology 35, S. 205-210.
- Alexander, S. L. and C. H. G. Irvine (1998): The

- effect of social stress on adrenal axis activity in horses: the importance of monitoring corticosteroid-binding globulin capacity. - *J. Endocrinol.* 157, S. 425-432.
- Beerda, B., M. B. H. Schilder, N. S. C. R. M. Janssen and J. A. Mol (1996): The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurement for a noninvasive assessment of stress responses in dogs. - *Hormone and Behav.* 30, S. 272-279.
- Bloom, S. R., A. V. Edwards, R. N. Hardy, K. W. Malinowskja and M. Silver (1975): Cardiovascular and endocrine responses to feeding in the young calf. - *J. Physiol. Lond.* 253, S. 135-155.
- Bowman, E. C. J., G. P. Roderick, S. R. Bloom and A. V. Edwards (1997): Role of adrenoceptors in the hypertensive response to feeding in the conscious calf. - *Am. J. Physiol.* 272 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 41), R607-R614.
- Bright, G. M. (1995): Corticosteroid-binding globulin influences kinetic parameters of plasma cortisol transport and clearance. - *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, S. 770-775.
- Calvert, P. A., P. M. Heck and A. V. Edwards (1998): Autonomic control of submandibular protein secretion in the anaesthetized calf. - *Exper. Physiol.* 83, S. 545-556.
- Cook, C. J. and L. H. Jacobson (1995): Salivary cortisol as an indicator of stress in sheep. - *N. Z. Vet. J.* 43, S. 248.
- Cook, N. C.; A. L. Schaefer, P. Lepage and S. D. Morgan Jones (1997): Radioimmunoassay for cortisol in pig saliva and serum. - *J. Agric. Fodd Chem.* 45, S. 395-399.
- Crookshank, H. R., M. H. Elissalde, R. G. White, D. C. Clanton and H. E. Snelly (1979): Effect of transportation and handling of calves upon blood serum composition. - *J. Anim. Sci.* 48, S. 430-435.
- Edwards, A. V. (1998): Regulation of adrenal function in the conscious calf. - *Horm. Metab. Res.* 30, S. 303-310.
- Edwards, A. V. and C. T. Jones (1993): Autonomic control of adrenal function. - *J. Anat.* 183, S. 291-307.
- Ermgassen, K. (1996): Untersuchungen zu Herzfrequenz und zu klinischen Vitalitätsparametern bei Kälbern in Beziehung zu Tragzeit, Geburtsverlauf, Geschlecht und Rasse. - *Vet. med. Diss. Leipzig.*
- Fenske, M. (1997): The use of salivary cortisol measurements for the non-invasive assessment of adrenal cortical function in guinea pigs. - *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 105, S. 163-168.
- Gayrard, V., M. Alvinerie and P. L. Toutain (1996): Interspecies variation of corticosteroid-binding globulin parameters. - *Dom. Anim. Endocrinol.* 13, S. 35-45.
- Gerra, G., A. Zaimovic, G. Giucastro, F. Folli, D. Maestri, A. Tessonni, P. Avanzini, R. Caccavari, S. Bernasconi and F. Brambilla (1998): Neurotransmitter-hormonal responses to psychological stress in peripubertal subjects: relationship to aggressive behavior. - *Life Sci.* 62, S. 617-625.
- Grant, D. A., J. E. Fewell, A. M. Walker and M. H. Wilkinson (1997): Oxygen transport and utilization during feeding in the young lamb. - *J. Physiol.* 503, S. 195-202.
- Gunnar, M. R., K. Tout, M. de Haan, S. Pierce and K. Stansbury (1997): Temperament, social competence, and adrenocortical activity in preschoolers. - *Dev. Psychobiol.* 31, S. 65-85.
- Fell, L. R. and D. A. Shutt (1984): Use of salivary cortisol as an indicator of stress due to management practices in sheep and calves. - *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 16, S. 203-206.
- Fell, L. R. and D. A. Shutt (1986): Adrenocortical response of calves to transport stress as measured by salivary cortisol. - *Can. J. Anim. Sci.* 66, S. 637-641.
- Haourigui, M., M. E. Martin, N. Thobie, C. Benassayag and E. A. Nunez (1993): Stimulation of the binding properties of adult rat corticosteroid-binding globulin by a lipolysis-induced rise in plasma free fatty acids. - *Endocrinology* 133, S. 183-191.
- Hennessy, M. B. (1997): Hypothalamic-pituitary-adrenal responses to brief social separation. - *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, S. 11-29.
- Kamimura, S., K. Mori, T. Ohgi, T. Hatta, M. Takahashi, T. Tuskamoto, S. Onoe, T. Hirai und T. Kudo (1987): Effect of transportation on milk and blood components in dairy cattle. - *Bull. Hokkaido Prefectural Agricultural Experimental Station* 56, S. 65-73.
- Ladewig, J. und K. Stribrny (1988): A simplified method for the stress free continuous blood collection in large animals. - *Lab. Anim. Sci.* 38, S. 333-334.
- Langille, B. L., S. L. Adamson and S. A. Jones (1989): Cardiovascular responses during feeding in young lambs. - *Am. J. Physiol.*, 257 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 26), R568-R573.
- Lassourd, V., V. Gayrard, V. Laroute, M. Alvinerie, P. Benard, D. Courtot and P. L. Toutain (1996): Cortisol disposition and production rate in horses during rest and exercise. - *Am. J. Physiol.* 271, R25-R33.
- Lay, D. C. Jr., T. H. Friend, K. K. Grissom, R. L. Hale and C. L. Bowers (1992): Novel breeding box has variable effects on heart rate and cortisol response of cattle. - *Appl. Anim. Behav. Sci.* 35, S. 1-10.
- Locatelli, A., P. Sartorelli, F. Agnes et al. (1989): Adrenal response in the calf to repeated simulated transport. - *Br. Vet. J.* 145, S. 517-522.
- Lyons, D. M., E. O. Price and G. P. Moberg (1988): Social modulation of pituitary-adrenal responsiveness and individual differences in behavior of young domestic goats. - *Physiol. Behav.* 43, S. 451-458.
- Lyons, D. M., E. O. Price and G. P. Moberg (1993): Social grouping tendencies and separation induced distress in juvenile sheep and goats. - *Dev. Psychobiol.* 26, S. 251-259.
- Martí, O., M. Martín, A. Gavalda, M. Giralt, J. Hidalgo, B. R.-S. Hsu, R. W. Kuhn and A. Armario (1997): Inhibition of corticosteroid-binding globu-

- lin caused by a serve stressor is apparently mediated by the adrenal but not by glucocorticoid receptors. - *Endocrine* 6, S. 159-164.
- Medeiros, M. dos Santos and A. J. Turner (1996): Metabolism and functions of neuropeptide Y. - *Neurochem. Res.* 21, S. 1125-1132.
- Molony, V., J. E. Kent and I. S. Robertson (1995): Assessment of acute and chronic pain after different methods of castration of calves. - *Appl. Anim. Behav. Sci.* 46, S. 3-48.
- Nogueira, G. P. and R. C. Barnabe (1997): Is the thoroughbred race-horse under chronic stress? - *Brazil. J. Med. Biol. Res.* 30, S. 1237-1239.
- Obminski, Z. and R. Stupnicki (1996): Effect of temperature and pH on the magnitude of the free fraction of cortisol in serum. - *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 104, S. 350-352.
- Scalzo, F. M. (1992): Cardiovascular responses to feeding in newborn piglets. - *Pediatr. Res.* 32, S. 33-38.
- Sgoifo, A., S. F. De Boer, J. Haller and J. M. Koolhaas (1996): Individual differences in plasma catecholamine and corticosterone stress responses of wild-type rats: relationship with aggression. - *Physiol. Behav.* 60, S. 1403-1407.
- Steffen, S. (1989): Die Nebennierenrindenfunktionsprüfung beim neugeborenen Kalb mit dem ACTH-Stimulierungstest. - *Vet. med. Diss. Hannover.*
- Steinhardt, M. und H.-H. Thielscher, H.-H. (1998): Reaktionen junger Milchrindkälber und junger Saugkälber der Mutterkuhhaltung auf Transport mit Straßenfahrzeugen. Effekte durch Alter und Haltungsbedingungen. - *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 105, S. 17-24.
- Steinhardt, M., H.-H. Thielscher, A. Lehr, B. Ihnen, S. Szalony, J. Ladewig und D. Smidt (1995): Klinisch-chemische und hämatologische Blutwerte und Anpassungsreaktionen bei Saugkälbern in den ersten Lebenswochen. - *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 102, S. 399 - 405.
- Steinhardt, M., H.-H. Thielscher, S. Bönner und D. Smidt (1995): Studien zum maternalen Milchtransfer und Wachstum von Saugkälbern der DRB, DSB und der Kreuzung Galloway x Holstein Friesian: Lebensalters- und Körpermassebereiche der Kälber. - *Landbauforschung Völkenrode* 45, S. 113-121.
- Steinhardt, M., H.-H. Thielscher, S. Bönner und D. Smidt (1995): Studien zum maternalen Milchtransfer und Wachstum von Saugkälbern der DRB, DSB und der Kreuzung Galloway x Holstein Friesian: Alter des Muttertieres und Merkmale des Kalbes. - *Landbauforschung Völkenrode* 45, S. 177-190.
- Steinhardt, M., H.-H. Thielscher, T. von Horn, R. von Horn, K. Ermgassen, H. Dehn, A. Lehr, S. Lottmann und W. Grünberg (1996): Physiologische Variablen bei Kälbern und ihre Bedeutung für Vitalität und Wachstum. - *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 103, S. 354-368.
- Steinhardt, M., H.-H. Thielscher, F. Zerbe und D. Smidt (1997): Entwicklungsqualität, Adaptationsreaktionen und klinisch-chemische Blutwerte von am Tränkeautomaten aufgezogenen Milchrindkälbern. - *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 104, S. 3-8.
- Svec, F. and A.-L. Shawar (1997): The acute effect of noontime meal on the serum levels of cortisol and dhea in lean and obese women. - *Psychoneuroendocrinology* 22, Suppl. 1, S. S115-S119.
- Takao, T., K. Hashimoto and Z. Ota (1988): Central catecholaminergic control of ACTH secretion. - *Regulatory Peptides* 21, S. 301-308.
- Taylor, J., P. Weyers, N. Harris and W. H. Vogel (1989): The plasma catecholamine stress responses is characteristic for a given animal over a one-year period. - *Physiol. Behav.* 46, S. 853-856.
- Trunkfield, H. R. and D. M. Broom (1990): The welfare of calves during handling and transport. - *Appl. Anim. Behav. Sci.* 28, S. 135-152.
- Trunkfield, H. R., D. M. Broom, K. Maatje, H. K. Wierenga, E. Lambooy and J. Kooijman (1991): Effects of housing on response of veal calves to handling and transport. - In: Metz JHM, Groenestein CM (ed), *New Trends in Veal Calf Production. Proc. Intern. Symp. Veal Calf Production, Wageningen, Netherlands, 14-16 March 1990, Wageningen: Pudoc, S.40-43.*
- Verkerk, G. A., A. M. Phipps, F. Carragher, L. R. Matthews and K. Stelwagen (1998): Characterization of milk cortisol concentrations as a measure of short-term stress responses in lactating dairy cows. - *Anim. Welfare* 7, S. 77-86.
- Waddell, B. J. and H. C. Atkinson (1994): Production rate, metabolic clearance rate and uterine extraction of corticosterone during rat pregnancy. - *J. Endocrinol.* 143, S. 183-190.
- Zavy, M. T., P. E. Juniewicz, W. A. Phillips and D. L. von Tungen (1992): Effect of initial restraint, weaning, and transport stress on baseline and ACTH-stimulated cortisol responses in beef calves of different genotypes. - *Am. J. Vet. Res.* 53, S. 551-557.

Verfasser: Steinhardt, Martin, Dr. vet. med. habil.; Thielscher, Hans-Hermann, Dr. vet. med., Institut für Tierzucht und Tierverhalten der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Institutsteil Trenthorst/Wulmenau, Leiter: Prof. Dr. sc. agr. Dr. habil. Dr. h. c. Franz Ellendorff.