

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der
Veterinärmedizin der Veterinärmedizinischen Universität von Wien

Institut für Tierschutzwissenschaften und Tierhaltung
(Leiter: Univ.-Prof. PhD. Jean-Loup Rault)

Injektion von Nelkenöl und Isoeugenol unter die Hornanlage von Kälbern: Auswirkungen auf die Herzfrequenzvariabilität

Diplomarbeit
Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von
Dominique Stöger

Wien, im März 2021

Betreuerin: Ao.Univ.-Prof.Dr.med.vet. Susanne Waiblinger

1.Gutachter/in: Ao.Univ.-Prof.Dr.med.vet. Susanne Waiblinger

2. Gutachter/in: Priv. Doz. Dr. Johannes Lorenz Khol

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Methoden	1
2.1	Tiere und Haltung.....	15
2.2	Versuchsaufbau	15
2.3	Versuchsablauf.....	18
2.4	Messung der Herzfrequenzvariabilität	19
2.5	Beschreibung der Stichprobe	23
2.6	Statistische Analyse.....	25
3	Ergebnisse.....	26
4	Diskussion	34
5	Zusammenfassung	39
6	Summary.....	41
7	Danksagung	42
8	Abkürzungen	43
9	Literaturverzeichnis	44
10	Tabellenverzeichnis	49

1 Einleitung

Auf österreichischen Almen weiden größtenteils unbehornte Rinder. 84 Prozent der rund zwei Millionen in Österreich gehaltenen Rinder, sind enthornt (Statistik-Austria, 2020, APA-OTS, 2013). Behornte Tiere findet man heutzutage vorwiegend in ökologischen Haltungssystemen oder in Betrieben, deren Zuchtverband die Enthornung bei Tieren generell ablehnt (Menzler, 2020). Der biologische Anbauverband Demeter beispielsweise verbietet sowohl die Enthornung von Kälbern als auch den Zukauf von enthornten Tieren. Das Einkreuzen männlicher oder der Zukauf weiblicher genetisch hornloser Zuchttiere ist ebenso verboten, kurz gesagt die Zucht und Haltung hornloser Tiere ist grundsätzlich nicht erlaubt (Demeter, 2020). Das Horn ist ein Gebilde der Haut und wird von drei Hautschichten, der Ober- (Epidermis), Leder- (Corium) und Unterhaut (Subcutis) gebildet. Am Beginn der Entwicklung, bilden sich zwei selbständige Knochensporen in der Unterhaut, welche dann allmählich im Laufe der Zeit mit dem Stirnbein zum eigentlichen Horn, welches zeitlebens wächst (Nickles and Starz, 2001), verwachsen (Kremer, 2002). Die Hörner dienen den Rindern in Rankämpfen als Halteapparat oder zum Abfangen der gegnerischen Stöße und ermöglichen somit ein artgerechtes Kräfteressen (Spengler Neff et al., 2015). Die Tiere nutzen die Hörner zur Körperpflege, beispielsweise um sich selbst zu kratzen. Eine weitere Funktion der Hörner ist die Wärmeregulation (Baars, 2016). Über das sogenannte ‚Wundernetz‘ (‚Carotid rete‘ (Daniel et al., 1953)) wird das arterielle Blut durch das aus den Hörnern und der Nasennebenhöhle kommende venöse Blut abgekühlt und somit die Temperatur des Organismus mitreguliert (Baars, 2016). Es wird ein Zusammenhang zwischen der Verdauung von Wiederkäuern und ihren Hörnern vermutet (Baars, 2019), jedoch ist diese Funktion, genauso wie die Funktion der Wärmeregulation wissenschaftlich nicht belegt. Die Hörner sind Wiedererkennungsmerkmal. Tiere erkennen sich untereinander an ihrer Silhouette, welche wiederum maßgeblich von ihren Hörnern bestimmt wird (Spengler Neff et al., 2015). Die Rangordnung wird ebenfalls maßgeblich von den Hörnern bestimmt, wohingegen bei hornlosen Tieren in erster Linie das Gewicht für den Rang entscheidend ist (Spengler Neff et al., 2015). Bei angemessenem Platzangebot, wird in behornnten Herden die Individualdistanz besser respektiert was zu mehr Ruhe und weniger Auseinandersetzungen innerhalb der Herde führt (Spengler Neff et al., 2015).

Begründet wird die Enthornung mit einem erhöhtem Unfallrisiko für den Menschen oder einem erhöhten Verletzungsrisiko für die Tiere innerhalb der Herde (Kling-Eveillard et al., 2015). Die Haltung behornter Tiere wird als zu problematisch angesehen. Bei der Bereitschaft des Tierhalters, das Haltungssystem an die Tiere anzupassen und somit auf die Bedürfnisse der Tiere einzugehen, ist die Haltung behornter Tiere nahezu Problemlos im Laufstall möglich (Waiblinger et al., 2011).

In Österreich muss laut 1. Tierhaltungsverordnung die Enthornung von Kälbern unter 6 Wochen von einer fachkundigen Person durchgeführt werden; Sedierung, Lokalanästhesie und postoperativ wirksame Schmerzmittel sind verpflichtend anzuwenden (1. ThaltungsVO, 1. Tierhaltungsverordnung, 2017). Kälber über 6 Wochen dürfen ausschließlich von einem Tierarzt enthornt werden. (1. Tierhaltungsverordnung, 2017).

Es existieren verschiedene Möglichkeiten für die Enthornung beim Rind, dazu zählen die thermische Enthornung mittels Brennstab beim Kalb oder die chirurgische Entfernung des Horns beim juvenilen und adulten Tier (Stafford and Mellor, 2011). Gummibänder zum Abbinden der Hornanlage und Ätztifte oder -pasten sind in Österreich nicht erlaubt (Tierschutzgesetz, TSchG). Das Zerstören der Hornanlage mit dem Thermokauter ist die am häufigsten angewandte Methode zur Entfernung der Hornanlage bei Kälbern von Milchrassen (Juffinger et al., 2019). Durch Einbrennen einer ca. 5 mm tiefen Furche um die Hornanlage, wird die Ernährungszufuhr zur Hornanlage unterbrochen (Buer and Palzer, 2016). Die chirurgische Entfernung des Horns sollte beim adulten Tier nur nach medizinischer Indikation erfolgen. Nach Wahl der geeigneten Methode wird entweder mit Drahtsäge, Hornmeisel, oder Hornschere beziehungsweise Hornschneider das Horn chirurgisch entfernt (Buer and Palzer, 2016). Bei der chemischen Enthornung wird eine ätzende Substanz auf die Hornanlage aufgetragen. Die Dosierung der ätzenden Paste gestaltet sich als äußerst schwierig, aus diesem Grund gibt es eigene Ätztifte, die ein Auftragen der Paste erleichtern sollen (Weiler, 1987). Zur Verwendung kommen Stoffe wie Kalium- und Natriumhydroxid, Salpeter- und Trichloressigsäure, Antimonchlorid oder Zinkchlorid-Lösungen flüssig bzw. kolloidal in Form von Ätzpasten (Rosenberger, 1964). Diese Methode ist in Österreich, wie bereits oben erwähnt, nicht erlaubt. Das, je nach Alter der Tiere und Stärke der Hörner 3-12 Wochen lang dauernde, Abschnüren durch das Anlegen straffer Gummiringe am Hornzapfen, mit dem Ziel ein Abfallen

der Hörnern inklusive knöchernem Hornzapfen zu bewirken (Weiler, 1987), ist in Österreich gemäß Tierschutzgesetz ebenso nicht erlaubt (TSchG).

Eine Alternative zur Enthornung ist die Zucht und Haltung von genetisch hornlosen Linien. Problem war hier der geringere Zuchtwert, den genetisch hornlose Stiere bislang immer hatten. Dieses Problem konnte jedoch durch spezielle Zuchtprogramme in den letzten Jahren deutlich verringert werden (Windig et al., 2015). Solche speziellen Zuchtprogramme, die teilweise bis zu 20 Jahren dauern, waren für die Rassen Fleckvieh, Charolais und Holstein erfolgreich. Dadurch sind nun immer mehr homozygote genetisch hornlose Stiere mit hohem genetischem Wert verfügbar (Windig et al., 2015). Aberdeen Angus, Polled Hereford oder Red Poll zählen zu den bekanntesten hornlosen Rinderrassen (White and Ibsen, 1936). Hornlosigkeit kommt sowohl rassetypisch als auch durch Spontanmutation in horntragenden Linien, wie beim Fleckvieh, Braunvieh oder beim Deutschen Holstein, vor. Die Wahrscheinlichkeitsrate für solche Spontanmutationen liegt bei 1:20000 (White and Ibsen, 1936). Tiere mit so einer Spontanmutation eignen sich optimal um das Merkmal hornlos in sonst behornnte Rassen einzukreuzen (White and Ibsen, 1936).

Der während der Enthornung entstehende psychophysiologische Stress und die, auf den Eingriff folgenden Schmerzen in den Wochen danach, stellen eine massive Einschränkung des Wohlbefindens der Tiere dar (Stafford and Mellor, 2005). Nach der Enthornung ist das betroffene Gewebe für mindestens 3 Wochen schmerzhaft und signifikant empfindlicher im Vergleich zu nicht behandeltem Gewebe (Adcock and Tucker, 2018). Neben möglichen Komplikationen wie zum Beispiel unvorhergesehene Blutungen durch Vorerkrankungen oder Verletzungen iatrogen Herkunft bedingt durch den Eingriff, wird die mehrwöchige Regenerationsphase nicht selten von Wundheilungsstörungen begleitet (Waiblinger et al., 2011). Der Eingriff ist für die Kälber schmerzhaft, belastet den Organismus und hat in weiterer Folge Einfluss auf das Sozialverhalten innerhalb der Herde (Waiblinger et al., 2011).

Die Schmerzhaftigkeit der Hornanlagenentfernung kann sowohl physiologisch, durch einen Anstieg des Kortisols im Blut (Kupczyński et al., 2014), als auch durch eine Veränderung im Verhalten der Kälber nachgewiesen werden (Schwartzkopf-Genswein et al., 2005). Bestimmte Parameter wie ein Anstieg der Kortisolkonzentration, die Tageszunahmen, die

Herzfrequenzvariabilität (HRV, heart rate variability) oder die Vokalisation der Tiere, werden als Parameter für die Schmerzbeurteilung herangezogen (Schwartzkopf-Genswein et al., 2005). Steht der Körper unter Stress, schüttet er das Hormon Kortisol aus der Nebennierenrinde aus (Engelhardt, 2015a). Kortisol gehört zu den Glucocorticoiden und ist ein Steroidhormon. Stress infolge von Schmerz, kann durch einen Anstieg der Kortisolkonzentration in Speichel oder Blut nachgewiesen werden (Engelhardt, 2015b). Bei Entfernung der Hornanlage ohne Betäubung und Schmerzausschaltung wird ein rascher Anstieg der Konzentration direkt nach dem Enthornen verzeichnet, welcher innerhalb von 30 Minuten seine Maximalkonzentration erreicht, gefolgt von einer Plateauphase für ungefähr 6 Stunden und im Anschluss daran eine Rückkehr zu dem Ausgangswerten innerhalb von 6-8 Stunden (Stafford and Mellor, 2011). Eine lokale Betäubung vor der Enthornung reduziert die Plasma-Kortisol-Reaktion abhängig vom gewählten Lokalanästhetikum für mindestens 1,5 Stunden (Grøndahl-Nielsen et al., 1999). Dass dieser Anstieg der Plasma-Kortisolkonzentration eine Reaktion auf den entstandenen Schmerz ist, beweist die Tatsache, dass bei Kälbern, die eine lokale Anästhesie bekommen haben, die Kortisolkonzentration verzögert eintritt, nämlich dann, wenn das Lokalanästhetikum aufhört zu wirken. Abhängig vom gewählten Arzneimittel kann man einen Anstieg der Kortisolkonzentration nach 2 h (Lidocain), 4 h (Bupivacain), 6 h (Lidocain gefolgt von Bupivacain) oder 8 h (Bupivacain 2-mal verabreicht) beobachten (Grøndahl-Nielsen et al., 1999). Die Verabreichung eines nichtsteroidalen Antiphlogistikum (NSAID) verhindert zwar nicht den Anstieg der Kortisolkonzentration, jedoch wird der Ausgangswert bereits nach 2h statt 8h erreicht, was eine deutliche Minimierung des Kortisol-Plateaus bedeutet (Stafford and Mellor, 2011). Da die Freisetzung von Kortisol viele verschiedene Ursachen haben kann, ist sie zur Beurteilung eines bestimmten Stressors alleine ein zu unspezifischer Parameter und sollte daher mit Vorsicht für die Interpretation herangezogen werden (Stock et al., 2013). Zusätzlich wurde festgestellt, dass ältere Kälber (Altersbereich zwischen zwei Tagen und zwei Wochen) unmittelbar vor, 3 Stunden nach und 6 Stunden nach Enthornung signifikant niedrigere Serumkortisolkonzentrationen aufwiesen (Stock et al., 2013), was dafür spricht, dass das Alter der Kälber ein Faktor ist, der bei der Auswertung und Analyse der Daten mit einbezogen werden muss (Stock et al., 2013). Es wurde gezeigt, dass der Parameter Kortisolkonzentration im Vergleich zu den Parametern Verhalten und Herzfrequenz (HR) nur von kurzer Dauer ist, und somit die Parameter Verhalten und HR mit wesentlich höherer Priorität zur Ermittlung von

Stress und Schmerzen zu sehen sind als die Kortisolkonzentration (Grøndahl-Nielsen et al., 1999).

Beim Verhalten weisen unter anderem Kopfschütteln, Ohrenbewegungen oder das Treten mit dem Hinterbein in Richtung Hornansatz bzw. Enthornungswunde auf das Vorhandensein von Schmerzen hin. Kopfschütteln, Ohrenschlagen (Ohrwischen), Kopfreiben, Wechsel zwischen Stehen und Liegen, apathisches Liegen, Vokalisation und Körperpflege sind alles Verhaltensweisen, die zur Bewertung von Schmerzen bei Kälbern (Rindern) erfasst und für die spätere Analyse herangezogen werden (Stock et al., 2013). Bei Gruppen, die enthornt wurden, zeigten sich dabei deutlich mehr Bewegungen in Form von Kopfschütteln und Tritten mit der Gliedmaße in Richtung Wunde als bei den Kontrollgruppen, welche nicht enthornt wurden (Grøndahl-Nielsen et al., 1999).

Bei der Interpretation der HR muss der Einsatz von im Zuge der Enthornung eingesetzten Sedativa, welche sich auf die Herzfrequenz auswirken, berücksichtigt werden. Im Vergleich zu scheinenthorneten Kälbern blieb die HR bei den enthornten Kälbern, die keine Analgesie erhielten, bis zu 3 Stunden lang erhöht (Grøndahl-Nielsen et al., 1999). Nach ungefähr 3 Stunden nahm die HR der Kälber wieder ab und befand sich anschließend in ähnlichen Bereichen wie die HR der Kälber der anderen Gruppen. Zusätzliche Studien haben nach dem Enthornen der Kälber eine verringerte Herzfrequenz bei jenen Gruppen, die mit einem Analgetikum behandelt wurden, im Vergleich zu der mit Placebo behandelten Kontrollgruppe gezeigt. (Grøndahl-Nielsen et al., 1999).

Der Sinusknoten ist Hauptschrittmacher und Impulsgeber unseres Herzens, und steht unter Kontrolle des autonomen Nervensystems (Killich, 2018). In gesunden Organismen spiegelt die HR die Wechselwirkung zwischen HR-reduzierender, vagaler bzw. parasympathischer und HR-steigernder, sympathischer Regulation wider (Borell et al., 2007). Die Informationsweiterleitung und Signalübertragung mit Acetylcholin und Noradrenalin als Transmitter, findet über Afferenzen ins Zentralnervensystem und nach Verschaltung über Efferenzen zurück zum Organ statt. Der Sympathikus mit Noradrenalin als Transmitter steigert die Überleitungsgeschwindigkeit, verkürzt die Refraktärzeit und beschleunigt die Depolarisation und somit die Herzschlagfrequenz. Noradrenalin bewirkt bei allen Herzmuskelzellen eine schnellere und kräftigere Kontraktion. Der Parasympathikus bewirkt genau das Gegenteil. Mit Acetylcholin als Transmitter verlängert er die Refraktärzeit,

verlängert die Überleitungsgeschwindigkeit und verlangsamt die Herzschlagfrequenz. Im Ruhezustand überwiegt immer der Parasympathikus bzw. Vagustonus, der sich durch langsame und tiefe Atmung beeinflussen lässt (Killich, 2018). Durch das komplexe Zusammenspiel der beiden Systeme, ist die Messung der HR zu unspezifisch, um sie als Parameter für die Beurteilung der regulatorischen Merkmale des autonomen Nervensystems (ANS) heranzuziehen, da in der Regel eine HR-Veränderung auf eine Aktivitätsänderung in beiden Systemen zurückzuführen ist (Borell et al., 2007). In der Tierschutzforschung wird die Herzfrequenzvariabilität (HRV) immer häufiger zur Beurteilung des sympathovagalen Gleichgewichts herangezogen (Borell et al., 2007). Da sich psychologische Belastungen auf das sympathovagale Gleichgewicht auswirken kann, ohne eine Veränderung in der Herz- oder Atemfrequenz zu verursachen, ist die HRV-Analyse eine genauere und detailliertere nichtinvasive Methode um die Reaktion des ANS zu beurteilen (Borell et al., 2007). Die Messung der HRV wird eingesetzt um Veränderungen im sympathovagalen Gleichgewicht, in Zusammenhang mit Krankheiten, psychischen oder physischen Umweltstressoren oder individuellen Merkmalen zu analysieren (Borell et al., 2007).

Die HRV beschreibt die variablen Abstände zwischen zwei Schlägen des Herzens. Eine gesunde Herzfunktion ist durch unregelmäßige Zeitintervalle zwischen aufeinanderfolgenden Herzschlägen gekennzeichnet (Stewart et al., 2008). Eine hohe Variabilität bei den Abstände zwischen zwei Herzschlägen ist ein Zeichen für einen guten Gesundheitszustand, wohingegen eine Verminderung der HRV als Indikator für eine höhere Belastung des Organismus zu sehen ist (Stewart et al., 2008). Ein hoher Sympathikustonius lässt die HRV abnehmen, wohingegen ein hoher Parasympathikustonius die HRV ansteigen lässt (Malik, 1996).

Mithilfe bestimmter linearer Parameter aus dem Zeitbereich (time domain, Tabelle 1) und dem Frequenzbereich (frequency domain, Tabelle 2) oder nicht linearen Parametern (Tabelle 3), kann die HRV analysiert werden. Durch Spektralanalyse lassen sich die unterschiedlichen Frequenzbereiche bestimmten Anteilen des vegetativen Nervensystems zuordnen. Niedere Frequenzen (LF) (0,04–0,15 Hz / Werte stammen aus der Humanmedizin) spiegeln die sympathische Kontrolle des Blutdrucks wider, wohingegen hohe Frequenzen (HF) (0,2–0,4 Hz / Werte stammen aus der Humanmedizin) den Atmungsrythmus reflektieren, also die parasympathische Kontrolle widerspiegeln (Saleh et al., 2000, Malik, 1996). Das LF/ HF

Verhältnis kann als Index für das sympathovagale Gleichgewicht angesehen werden (Malik, 1996)

Tabelle 1-HRV-Parameter (Zeitbereichs-Parameter)

(Malik, 1996)

Zeitbereich		
Variable	Einheit	Beschreibung
SDNN ¹	ms	Standardabweichung NN Intervall
RMSSD ²	ms	Die Quadratwurzel des Mittelwerts der Summe der Quadrate der Differenzen zwischen benachbarten NN-Intervallen
RMSSD/SDNN		Quotient von RMSSD und SDNN
MEANHR ³	bpm	Mittlere Herzfrequenz
pNN50 ⁴	%	NN50-Anzahl geteilt durch die Gesamtzahl der NN-Intervalle.
HRV ⁵ triangular index		Gesamtzahl aller NN-Intervalle geteilt durch die Höhe des Histogramms aller NN-Intervalle.

¹SDNN= Standard Deviation of the NN Interval, ²RMSSD= Root Mean Square of Successive Differences,³MEANHR= Mean heart rate, ⁴pNN50= Percentage of successive RRs > 50ms (in %), ⁵HRV= Heart rate variability**Tabelle 2 – HRV-Parameter (Frequenz-Bereich Parameter)**

(Malik, 1996)

Frequenzbereich			
Variable	Einheit	Beschreibung	Frequenz
LF ¹	ms ²	Leistung im Niederfrequenzbereich	0.04-0.15 Hz
LF power	n.u.	LF-Leistung in normalisierten Einheiten	
HF ²	ms ²	Leistung im Hochfrequenzbereich	0.15-0.4 Hz
HF power	n.u.	HF-Leistung in normalisierten Einheiten	
LF/HF		Verhältnis LF / HF	

¹LF= High Frequency, ²HF= Low Frequency,

Tabelle 3 – HRV-Parameter (Nicht lineare HRV-Parameter)

(Malik, 1996, Nöbauer, 2011)

Nicht lineare Parameter		
Variable	Einheit	Beschreibung
Recurrence (rp*rec ¹)	%	Prozentsatz der wiederkehrenden Punkte in der Grafik; Wiedergabe einzelner Vektoren in einem n-dimensionalen Raum, steht für die Gleichmäßigkeit der HRV (Je höher der Wert, desto niedriger die Variabilität)
Determinism (rpadet ²)	%	Prozentsatz der wiederkehrenden Punkte, die eine aufsteigende diagonale Linie bilden, steht für die Gleichmäßigkeit der HRV
Entropy (rpshen ³)		Mittlerer Informationsgehalt der Linien im Längsverlauf, Informationsgehalt der dynamischen Entwicklung

*Rp= Recurrence Plot, ¹Rprec= recurrence rate (in %), ²rpadet= determinism (in %), ³rpshen= shannon entropy

Die oben erwähnten Studien verdeutlichen, dass die thermische Enthornung von Kälbern ein schmerzhafter Prozess mit oft langfristiger Belastung für das Wohlergehen der Tiere ist. Eine mögliche Alternative zu den bisher angewandten Methoden, um das Hornwachstum zu verhindern, könnte die Injektion von Nelkenöl oder dessen Reinsubstanz Eugenol bzw. Isoeugenol unter die Hornknospe sein (Molaei et al., 2015). Ziel der Injektion mit Nelkenöl oder Eugenol bzw. Isoeugenol ist die Zerstörung der Hornanlage (Molaei et al., 2014). Die Gewürznelke wird, wie von Hofmann und Melzig (2014) beschrieben, sowohl in der Schul- als auch in der Komplementärmedizin eingesetzt. Die Eigenschaften der Gewürznelke wurden bereits im 15. Jahrhundert v. Chr. in den ayurvedischen Büchern von Bhavamisra beschrieben (Hofmann and Melzig, 2014). In der römischen Kaiserzeit fand die Gewürznelke, über das rote Meer ihren Weg ins Mittelmeergebiet. Seit Jahrhunderten wird die Gewürznelke (*Caryophylli flos*) und das daraus stammende Nelkenöl (*Caryophylli floris aetheroleum*) als Arznei-, Gewürz- und Aromatisierungsmittel genutzt (Hofmann and Melzig, 2014). Gewürznelken sind die getrocknete Blütenknospen des, zur Familie der Myrtengewächse gehörenden, Gewürznelkenbaums (*Syzygium aromaticum*). Nelkenöl besteht aus vielen, manchmal bis zu 36, verschiedenen Komponenten, unter anderem aus Phenylpropanoiden und Benzylalkoholen (Chaieb et al., 2007). Gewürznelken bestehen zu 15-23 % aus ätherischem Öl. 75-85 % und somit Hauptbestandteil und wirkende Substanz des Nelkenöls ist Eugenol (Hofmann and

Melzig, 2014). Eine Übersicht mit den wichtigsten Inhaltsstoffe ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4 Inhaltsstoffe Gewürznelke
(Hofmann and Melzig, 2014)

Stoffgruppe	Inhaltsstoff
ätherisches Öl (15–23 %)	Eugenol (70–90 %), Acetyleugenol (bis 17 %), β -Caryophyllen (5–12 %), Heptan-2-on, Octan-2-on
Acetophenonderivate	2,6-Dihydroxy-4-methoxy-acetophenon und 4-O-Methyl-acetophenon
Flavonoide (0,5 %)	Quercetin-, Kämpferolglykoside
Chromonglykoside	Biflorin, Isobiflorin
Gerbstoffe (10 %)	Gallussäurederivate: u. a. Eugeniin
Phenolcarbonsäuren	p-Hydroxybenzoesäure, Salicylsäure, Syringasäure, Vanillinsäure, Gentisinsäure, Protocatechusäure
Triterpene, Sterole	u. a. Oleanolsäure (1–2 %), 2 α -Hydroxyoleanolsäure (0,15 %), β -Sitosterol- β -D-glucosid

Eugenol ist ein Phenylpropanoid und der Hauptbestandteil von Nelkenöl. Eugenol ist antimikrobiell, antioxidativ, antimykotisch, antiviral, antiphlogistisch, antitumoral, osteoprotektiv, zytotoxisch, insektenabweisend, hat einen anästhetischen Effekt, wirkt in hohen Dosen sedierend und in noch höheren Dosen narkotisierend (Velisek et al., 2005, Chaieb et al., 2007). Isoeugenol kommt natürlich in verschiedenen Pflanzen und unter anderem auch im Nelkenöl vor kann aber auch synthetisch aus Eugenol hergestellt werden (Frahm et al., 2020, Cartus, 2009). Isoeugenol ist eine farblos bis gelbliche, ölige Flüssigkeit mit charakteristischen Geruch und wird mit Hilfe von Alkalien, durch Isomerisierung von Eugenol zu Isoeugenol, synthetisiert (Oltmanns, 2019, Cartus, 2009). Isoeugenol unterscheidet sich von Eugenol durch die Lage der Doppelbindungen. Es riecht weniger intensiv und ist daher angenehmer im Geruch (Cartus, 2009). Die antiphlogistische Eigenschaft beruht auf einer Hemmung der Cyclooxygenase. Ein hohes Komplexbildungspotenzial durch Gewürznelkenextrakt wurde für Fe^{3+} nachgewiesen, wodurch die Produktion von Hydroxylradikalen verhindert wird (Hofmann and Melzig, 2014). Es kann somit zur Bekämpfung freier Radikale eingesetzt werden und zeigte bakterizide Wirkung unter anderem gegen *S. aureus* und *E. coli* (Radünz et al., 2019). Eugenol ist von der Food and Drug Administration (FDA) als „sicher“ (GRAS= Generally Recognized AS Safe) eingestuft und als Lebensmittelzusatzstoff zugelassen worden. Bei einer unverdünnten Anwendung wirkt Eugenol jedoch gewebssreizend und neurotoxisch, verdünnt unter anderem zytotoxisch (Hofmann and Melzig, 2014). Genau diesen Effekt versucht man sich bei der chemischen Enthornung zu Nutze zu machen. Eine Studie aus dem Iran bewertete die Auswirkungen von Nelkenöl als mögliche Alternative zur Enthornung bei neugeborenen Kälbern (Molaei et al., 2014). In der Studie wurden zwölf Kälber, im Alter von 5 Tagen zufällig 3 verschiedenen Gruppen zugeteilt. Gruppe 1 erhielt 0,5 ml Nelkenöl, Gruppe 2 erhielt 0,5 ml Dimethylsulfoxid und Gruppe 3 erhielt 0,5 ml physiologische Kochsalzlösung. Die jeweilige Substanz wurde immer unter die linke Hornknospe injiziert. Die rechte Seite wurde bei allen Tieren ausgelassen und diente als Beweis, dass die Tiere ursprünglich horntragend waren. Die Hornwachstumsrate und die klinischen Parameter wie Atmung, Temperatur und Puls wurden in bestimmten Zeitintervallen bewertet. Die Ergebnisse der Studie sprechen dafür, dass eine Injektion mit Nelkenöl unter die Hornknospe das Hornwachstum effektiv stoppt (Molaei et al., 2014). Eine weitere Studie aus dem Iran hat die Wirksamkeit einer Injektion mit Nelkenöl unter die Hornknospe von Ziegenkitzen als mögliche

Methode der chemischen Enthornung getestet (Molaei et al., 2015). In der Studie wurden 5 Tage alte, gesunde Ziegenkitz beiderlei Geschlechts zufällig 4 Gruppen zugeteilt. Den Gruppen 1, 2 und 3 wurde einmalig 0,2 ml Nelkenöl unter die linke Hornknospe injiziert. Die Gruppe 4 diente als Kontrollgruppe und erhielt anstelle von Nelkenöl, 0,2 ml physiologische Kochsalzlösung. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass das Hornwachstum durch eine Injektion mit Nelkenöl gestoppt werden konnte. Die histopathologischen Untersuchungen ergaben vollständige Nekrosen der Epidermis und der darunter liegenden Schichten, mit Lyse des Kollagens im Hornknospengewebe, 5 Tage nach der Injektion. Nach 10 Tagen, konnte ein beginnender Heilungsprozess beobachtet werden. Die Autoren kamen nach der Studie zu dem Entschluss, dass die Enthornung mit Nelkenöl eine durchaus mögliche Alternative zur thermischen Enthornung bei Tieren ist (Molaei et al., 2015). Ausgehend von dieser Studie wurden weitere Studien gestartet (Hempstead et al., 2018, Schoiswohl et al., 2020, Juffinger et al., 2019). In allen vergleichbaren Studien blieben die Erfolge wie in der Studie von Molaei et al. (2015) beschrieben bis dato aus. Die Studie von Hempstead et al. (2018) bewertete die Wirksamkeit von Nelkenöl und der thermischen Enthornung bei Ziegenkitzen über einen Zeitraum von 3 Monaten. Die Ergebnisse der bisherigen Studien sprechen zwar für weniger Schmerzen bei der Injektion von Nelkenöl unter die Hornknospe, eventuell aufgrund geringerer Gewebsschädigung als bei der thermischen Enthornung, jedoch konnte das Hornwachstum durch die Injektion mit Nelkenöl teilweise nicht verhindert werden (Hempstead et al., 2018, Schoiswohl et al., 2020). Eine weitere Studie (Sutherland et al., 2018) konzentrierte sich auf die Bewertung und den Vergleich bestimmter Verhaltensreaktionen von Kälbern direkt vor und kurz nach unterschiedlichen Methoden der Enthornung. Es wurden vier unterschiedliche Gruppen untersucht. Gruppe eins diente als Kontrollgruppe. Gruppe zwei erhielt 0,5 ml Nelkenöl unter die Hornknospe. Gruppe drei wurde mit dem Brennstab enthornt und Gruppe vier wurde ebenfalls mit dem Brennstab enthornt bekam jedoch zuvor ein Lokalanästhetikum. In der Studie wurden die physiologischen Reaktionen des Organismus nach der jeweiligen Methode der Enthornung untersucht und miteinander verglichen. Die Ergebnisse der Studie wiesen darauf hin, dass die Enthornung mit Nelkenöl in den ersten 24 Stunden nach dem Eingriff weniger schmerzhaft ist als die Enthornung mit dem Brennstab.

Die vorliegende Studie unterscheidet sich von den bisherigen Studien, durch die Anwendung von Isoeugenol (synthetische Reinsubstanz des im Nelkenöl vorkommenden Eugenols) als

zusätzliche Methode der Enthornung und durch eine ausgedehntere Untersuchung des Wohlbefindens der Kälber im Anschluss an den jeweiligen Eingriff. Sutherland et al. (2018) codierte das Verhalten der Kälber 2 Stunden vor und 2 Stunden nach dem Eingriff und die komplette Versuchsperiode dauerte in Summe 48 h. Im Vergleich zu bisherigen Studien, konzentrierte sich unsere Studie auf die Bewertung und den Vergleich längerfristiger Verhaltensreaktionen nach der Enthornung, den Vergleich von Isoeugenol gegenüber der Enthornung mit dem Brennstab und die Analyse der HRV als Ergänzung zur HR, um Rückschlüsse auf die Schmerzhaftigkeit des jeweiligen Eingriffes ziehen zu können.

Meine Diplomarbeit ist Teil des Dissertationsprojektes von Frau Anna Juffinger „Nelkenöl und Isoeugenol als Alternative zur thermischen Enthornung bei Kälbern“, das wiederum eingebettet ist in das Forschungsprojekte „Untersuchungen zur Verhinderung des Hornwachstums bei Ziegenkitzen und Kälbern durch Injektion von Nelkenöl und Isoeugenol“, einer Kooperation zwischen der Universitätsklinik für Wiederkäuer und dem Institut für Tierschutzwissenschaften und Tierhaltung der Veterinärmedizinischen Universität Wien. Das Dissertationsprojekt von Frau Mag. Anna Juffinger unterscheidet sich von den bisherigen Studien durch die Anwendung von Isoeugenol (synthetische Reinsubstanz des im Nelkenöl vorkommenden Eugenols) als zusätzliche Methode der Enthornung und durch eine ausgedehntere Untersuchung des Wohlbefindens der Kälber im Anschluss an den jeweiligen Eingriff. Meine Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, welchen Einfluss verschiedene Methoden der Enthornung (Injektion mit Nelkenöl bzw. Isoeugenol unter die Hornanlagen, thermische Enthornung) bzw. eine Kontrollmanipulation (Injektion mit NaCl unter die Hornknospen) auf die Herzfrequenzvariabilität (HRV) der Kälber, als Indikator für Wohlbefinden, haben. Durch Analyse des Verhaltens und Messung der mechanisch nozizeptiven Schwelle, der Herzfrequenzvariabilität, des Hornwachstums und der Gewebsveränderung sollte im Projekt die Hypothese, dass eine Injektion von Nelkenöl bzw. Isoeugenol unter die Hornknospe Einschränkungen des Wohlbefindens im Vergleich zur Injektion mit physiologischer Kochsalzlösung, jedoch weniger Einschränkungen als die thermische Enthornung verursacht, untersucht werden. In meiner Diplomarbeit als Teilprojekt des Dissertationsprojekt von Frau Anna Juffinger wird bezogen auf die HR und HRV folgende Hypothese untersucht:

Hypothese 1: Die Injektion von Nelkenöl bzw. Isoeugenol unter die Hornknospe führt zu geringerer Einschränkung des Wohlbefindens der Kälber durch geringeren Grad an Schmerz und Stress als die thermische Enthornung mit dem Brennstab.

Hypothese 2: Die Injektion von Nelkenöl bzw. Isoeugenol unter die Hornknospe verursacht gewisse Einschränkungen des Wohlbefindens im Vergleich zur Injektion mit physiologischer Kochsalzlösung.

Die höchste HRV und geringste HR wird demnach bei der Kontrollgruppe, welche eine Injektion mit Kochsalzlösung erhält, erwartet. Die geringste HRV und höchste HR wird bei den Tieren, die mit Brennstab enthornt werden, erwartet. Die mit Nelkenöl oder Isoeugenol behandelten Tiere, sollten gemäß der angeführten Hypothese zwischen Kontrollbehandlung und Enthornung mit dem Brennstab liegen.

2 Methoden

2.1 Tiere und Haltung

Für das Projekt wurden, von Juli 2018 bis April 2019, 40 weibliche und männliche Kälber (13 weibliche und 27 männliche) der Rasse Fleckvieh (38) und Fleckvieh*Braunvieh (2), im Alter von 1-5 Tagen, aus der Nachzucht der Vetfarm, ehemaliges Lehr und Forschungsguts (LFG) der veterinärmedizinischen Universität Wien ausgewählt. Alle 40 Kälber wurden an der VetFarm am Kremesberg, Pottenstein, Österreich, geboren.

Die Kälber wurden nach der Geburt von der Mutter getrennt, erstversorgt, mit mindestens 2 l Kolostrum getränkt und anschließend in ein Kälberiglu verbracht. Die ersten 10 bis 14 Tage wurden die Kälber einzeln in Kälberiglus und anschließend in Gruppen mit maximal neun Tieren, nach Alter gruppiert, gehalten. Jedes Iglu inklusive Auslauf, hatte die gleichen Maße (147 cm x 109 cm x 117 cm), war mit einem Wassereimer und einer Heuraufe ausgestattet und mit reichlich Stroh eingestreut. Die Kälberiglus standen im Freien, waren aber zum Schutz vor den Witterungsverhältnissen unter einem Dach aufgestellt. In den ersten 5 Tagen nach der Geburt wurden die Kälber 3-mal täglich aus Eimern mit 2l Kolostrum und danach 2-mal täglich mit 3l Vollmilch, getränkt. Wasser und Heu standen *ad libitum* zur Verfügung.

2.2 Versuchsaufbau

Die Studie wurde von der Ethik- und Tierschutzkommission der Veterinärmedizinischen Universität Wien geprüft und befürwortet sowie in Übereinstimmung mit der Good Scientific Practice und unter Beachtung der einschlägigen nationalen Rechtsvorschriften durchgeführt. Die Tierversuchsgenehmigung (BMWFWD68.205/0049DWF/V/3b/16) wurde durch das Bundesministerium für Wissenschaft, Forschung und Wirtschaft (BMFWF) erteilt. Die 40 Kälber wurden zufällig, alternierend nach Geburtszeitpunkt, vier unterschiedlichen Behandlungen zugeteilt, wobei immer 10 Tiere einer Behandlung zugeordnet wurden. Die Behandlungsgruppen sind in Tabelle 5 dargestellt. Abhängig von der Zugehörigkeit zur jeweiligen Behandlung, wurde das Kalb entweder mit dem Brennstab enthornt oder es wurde pro Seite 1,5 ml Nelkenöl, Isoeugenol bzw. physiologische Kochsalzlösung unter die Hornanlagen injiziert. Die Injektion erfolgte mit einer Nadel der Stärke 16 G (BOVIVET 16G

x 1-1/2" 1.6 x 38mm, Jørgen KRUUSE A/S, Denmark) unter die Hornknospe, bei rostro-medialer Führung in Richtung Ohrbasis. Für die Injektion wurden die Kälber von maximal 2 Personen fixiert und der Kopf wurde am Boden fixiert, um eine korrekte Applikation der jeweiligen Substanz zu ermöglichen.

Tabelle 5 - Behandlungsgruppen

Behandlung	Lokalanästhetikum	Sedierung	Analgetikum	Abkürzung	Anzahl Kälber
Injektion mit Nelkenöl	Nein	Nein	Nein	CLOVE ¹	10
Injektion mit Isoeugenol	Nein	Nein	Nein	ISO ²	10
Enthornung mit dem Brennstab	Ja	Ja	Nein	BURN ³	10
Injektion physiologische Kochsalzlösung	Nein	Nein	Nein	CON ⁴	10

¹CLOVE= Nelkenöl, ²ISO= Isoeugenol, ³BURN= Brennstab, ⁴CON= Kontrolle

Für die Enthornung mit dem Brennstab wurden die Kälber mit Xylazin (0,1 mg/kg i.m., Sedaxylan 20mg/ml, Eurovet Animal Health B.V., AE Bladel, 137 Niederlande) sediert und erhielten eine Lokalanästhesie (LA) mit Procainhydrochlorid (5 ml/Seite, s.c., Procamidol 20mg/ml, Richter Pharma AG, Wels Austria). Der Eingriff wurde abwechselnd von einer von insgesamt zwei Tierärztinnen der Universitätsklinik für Wiederkäuer durchgeführt.

Zur Ermittlung der HRV wurden zu folgenden Zeitpunkten Daten erhoben:

- **Tag 0** (Tag der Enthornung): 2 Stunden vor dem Eingriff bis 6 Stunden nach dem Eingriff (insgesamt 8 Stunden)
- **Tag 1** (Tag nach der Enthornung): 22 Stunden bis 30 Stunden nach der Enthornung (insgesamt 8 Stunden).
- **Tag 3 und Tag 7**: jeweils 4 Stunden in einem zu Tag 0 vergleichbaren Zeitraum (insgesamt 4 Stunden)

Tabelle 6 - Tagesablauf Tag 0 (Tag des Eingriffes)

Tag 0	
Uhrzeit	HRV ¹ -Datenerfassung
08:00	HR ² -Gurt anlegen und HR-Aufzeichnung
10:00	Eingriff
12:00	HR ² -Gurt Wechsel
12:00	HR ² -Aufzeichnung
16:00	HR ² -Gurt Abnahme

¹HRV= heart rate variability, ²HR= heart rate,

Tabelle 7 - Tagesablauf Tag 1

Tag 1	
Uhrzeit	HRV ¹ -Datenerfassung
08:00	HR ² -Gurt anlegen und HR-Aufzeichnung
12:00	HR ² -Gurt Wechsel
12:00	HR ² -Aufzeichnung
16:00	HR ² -Gurt Abnahme

¹HRV= heart rate variability, ²HR= heart rate,

Tabelle 8 - Tagesablauf Tag 3

Tag 3	
Uhrzeit	HRV ¹ -Datenerfassung
08:00	HR ² -Gurt anlegen und HR-Aufzeichnung
12:00	HR ² -Gurt Abnahme

¹HRV= heart rate variability, ²HR= heart rate,

Tabelle 9 - Tagesablauf Tag 7

Tag 7	
Uhrzeit	HRV ¹ -Datenerfassung
08:00	HR ² -Gurt anlegen und HR-Aufzeichnung
12:00	HR ² -Gurt Abnahme
12:10	Messung Gewicht

¹HRV= heart rate variability, ²HR= heart rate,

Neben den Erhebungen der HR/HRV für diese Diplomarbeit fanden zudem Direktbeobachtungen des Verhaltens, Erhebungen der mechanisch nozizeptiven Schwelle (MNS), Speichelprobennahmen zur Messung der Kortisolkonzentration, Erhebungen zu Oberflächentemperatur, Gewebsveränderungen bzw. Wundheilung der Hornknospe bzw. der Hornwunde, Hornwachstum, und Gewicht der Kälber statt (Juffinger et al., 2021).

2.3 Versuchsablauf

Im folgenden Abschnitt wird der zeitliche Ablauf für die verschiedenen Versuchstage und die Erhebung der HR und HRV Daten genau dargestellt.

Tag 0 – Tag des Eingriffs

Am Tag des Eingriffs wurde dem Kalb um 08:00 Uhr ein Gurt zur Messung der HR/HRV (Details siehe 2.4.) angelegt und die Messung gestartet. Im Anschluss daran wurde das Kalb im Bereich der Hornanlage und deren Umgebung ausrasiert und Messpunkte für die MNS-Erhebung mit einem Edding-Stift eingezeichnet. Danach wurde die Größe der Hornanlage gemessen. Im Anschluss an die Vorbereitung fand eine zwanzig-minütige Direktbeobachtung statt, danach wurde die Oberflächentemperatur der Hornanlage mit einer Thermokamera in Form von IR-Bildern ermittelt und die MNS des Kalbes wurde rund um die Hornanlage an den zuvor markierten Messpunkten, getestet. Um ca. 10:00 Uhr fand der jeweilige Eingriff und parallel zum Eingriff eine Verhaltensbeobachtung statt. 15 Minuten nach dem Eingriff wurde wieder die Oberflächentemperatur der Hornanlage mittels Thermokamera in Form von IR-Bildern ermittelt, die MNS getestet und die Horn- und Wundgröße gemessen. 40 Minuten nach dem Eingriff wurde das Kalb erneut 20 Minuten beobachtet. Am Tag 0 wiederholte sich die 20-

minütige Beobachtung stündlich bis 6 Stunden nach dem Eingriff und dann nochmals drei Stunden später, also 9 Stunden nach dem Eingriff. Somit fanden am Tag des Eingriffes acht 20-minütige Direktbeobachtungen des Verhaltens statt und eine Beobachtung direkt während des Eingriffs. Um 12 Uhr wurde der HR-Empfänger gewechselt, da die maximale Aufnahmezeit etwa 4 Stunden beträgt. Um 16:00 Uhr wurde der HR-Gurt abgenommen und die Messung nach insgesamt 8h gestoppt. 6h und 9h nach dem Eingriff wurden im Anschluss an die 20-minütige Direktbeobachtung erneut IR-Bilder gemacht und die MNS wurde gemessen

Tag 1

Am Tag nach dem Eingriff wurde um 08:00 Uhr in der Früh ein Gurt zur Messung der HR/HRV (Details siehe 2.4.) angelegt. Zwischen 08:10 Uhr und 08:30 Uhr fand eine 20-minütige Direktbeobachtung statt. Anschließend wurde die MNS sowie die Hornanlagen bzw. Wundgröße gemessen. Um 12 Uhr wurde der HR-Empfänger gewechselt. Um 16 Uhr, 4 Stunden später, wurde der HR-Gurt mit dem Sensor abgenommen und die Aufnahme gestoppt.

Tag 3 und Tag 7

An Tag 3 und Tag 7 wurde um 08:00 Uhr in der Früh ein Gurt zur Messung der HR/HRV (Details siehe 2.4.) angelegt. Zwischen 08:10 und 08:30 fand eine 20-minütige Direktbeobachtung statt. Anschließend wurde die MNS sowie die Hornanlage bzw. Wundgröße gemessen. An Tag 3 und Tag 7 wurde der HR-Empfänger um 12 Uhr abgenommen und die Aufzeichnung gestoppt. An Tag 7 wurde im Anschluss an die HR-Gurt Abnahme um 12:10 Uhr das Gewicht des Kalbes erhoben.

2.4 Messung der Herzfrequenzvariabilität

2.4.1 Datenerhebung der Zwischenschlagintervalle

Die Erfassung der RR-Intervalle erfolgte mit einem Transmitter (T 31 Sender codiert, Polar Elektro Oy, Kempele, Finnland) und Empfänger (S810) von Polar®. Für die Messung der HRV wurde reichlich Ultraschallgel als Kontaktmedium auf den Elektrodengurt aufgetragen und der Transmitter wurde seitlich am Thorax des Kalbes, in Höhe der Herzbasis, befestigt. Der Empfänger S810 (Polar Elektro Oy, Kempele, Finnland) wurde, mittels speziell dafür konstruieren Gurt aus dem Reitersport mit eingenähter Tasche, in einem Abstand von 10 cm zum Transmitter, am Brustkorb des Kalbes befestigt. Die maximale Aufnahmezeit der RR-

Intervalle pro Empfänger beträgt ca. vier Stunden. Die Datenübertragung auf ein Notebook erfolgte mittels Infrarotlesegerät. Das Verhalten der Kälber wurde während des kompletten Versuches mit einem festinstallierten Videokamerasystem mit Geovision System (GeoVision, Surveillance System V8.5.6) aufgezeichnet. Eine spezielle Infrarotfunktion (Infrarotscheinwerfer Fa. Microlight, IR-LED294S-90 (880nm, 90°)) erlaubte neben den normalen Tagesaufnahmen auch Nachtaufnahmen. Für die HR und spätere HRV-Analyse wurde das Verhalten der Tiere, wie Stehen oder Liegen, berücksichtigt. Es wurden nur Daten mit Abschnitten von Tieren in Ruhe, definiert durch ein Kalb in Liegeposition, frei von jeglicher Störung oder Manipulation und weniger als 5 Fehlerprozent pro Minute bei der aufgezeichneten Herzfrequenzkurve, verwendet und ausgewertet.

2.4.2 Aufbereitung der Daten

Für die HR und spätere HRV-Analyse wurde das Verhalten der Tiere, wie Stehen oder Liegen, berücksichtigt. Es wurden nur Daten mit Abschnitten von Tieren in Ruhe, definiert durch ein Kalb in Liegeposition, frei von jeglicher Störung oder Manipulation und weniger als 5 Fehlerprozent pro Minute bei der aufgezeichneten Herzfrequenzkurve, verwendet und ausgewertet (Hagen et al., 2005). Mit Hilfe des Softwareprogrammes Polar Precision Performance SW Version 4.03.050 wurden die ausgelesenen Daten bearbeitet und korrigiert. Die Kurven wurden in 1-minütigen Intervallen auf ihren Fehleranteil überprüft und dann unter Rücksichtnahme der zuvor definierten Ausschlusskriterien, wie Stehen, Liegen, Manipulation oder den Eingriff selbst, entweder korrigiert oder von der Verwendung ausgeschlossen. Für meine Diplomarbeit wurden 3 Messzeitpunkte, Tag 0 (vor Enthornung), Tag 1 nach Enthornung und Tag 7 nach Enthornung für die Datenauswertung herangezogen. Es wurden nur Daten von Messungen ausgewählt, die zum selben Zeitpunkt stattgefunden haben. Bei den ausgewählten Daten von Tag 0, 1 und 7 waren es die Messungen 1, 3 und 6 von 08:00-11:30 Uhr.

2.4.2.1 Auswahl der Liegeperioden

Für die Auswertung wurden Daten herangezogen mit einer Mindestlänge von 5 Minuten, Liegezeit frei von Manipulationen, Eingriffen oder anderen sichtbaren äußeren Einflüssen. Pro Kalb wurden die Abschnitte fortlaufend, ohne Rücksicht auf die Messzeitpunkte, nummeriert, um wiederholte Messungen zu kennzeichnen. Pro Kalb wurden 24 Stunden Zwischenschlagsintervalle aufgezeichnet. Bei der Videoauswertung wurden die Steh und Liegezeiten, die Manipulation der Tiere und die Geschehnisse in der Umgebung erfasst. Die Videoaufzeichnungen wurden mittels Solomon Coder beta 17.03.22 codiert. Das Verhalten der Kälber wurde unter zuvor definierten Verhaltensweisen (Ethogramm siehe Tabelle 10, um Konsistenz zu gewährleisten wurde das bereits vorhandene englischsprachige Ethogramm von Anna Juffinger verwendet), anhand kontinuierliche Fokustierbeobachtung, erfasst. Kodierung des Verhaltens mittels Solomon Coder an Tag 0 vor dem jeweiligen Eingriff, sowie an Tag 1, Tag 3 und Tag 7.

Tabelle 10 - Ethogramm Direktbeobachtung

(übernommen von Juffinger, persönliche Mitteilung)

	Behavior	Definition
standing	basic	Body position in which the limbs bear the bodyweight and the animal is stationary (incl locomotion, play)
lying	basic	Sternal or lateral recumbency: sternum or flank are in contact with the ground and no weight is supported by any of the legs
not visible	others	It's not possible to see if calf is standing or lying!
manipulation	others	Calf is handled by experimenter or other person, starts when door to hutch is opened and ends when person leaves the hutch (door is closed)
disturbances	Others	Disturbances caused by vehicles or humans, which could be seen in a additional camera filming the surrounding
vehicle visible	others	A vehicle passes near the calf's hutch and may affect the calf's behavior
humans visible	others	One or more humans may stay or walking by close to the calf and may affect the calf's behavior It starts when human visible in camera for surrounding and last until human leaves the are next to the calf hutches (not visible in the surrounding camera anymore). If only the leaving of the human is visible, its supposed that the human has been next to the calf the whole time and therefore human visible is coded from the beginning until the human is not visible in the surrounding camera. If the experimenter is visible in the surrounding camera, but is sitting and not influencing/considering the calf, this is not coded as humans visible!

Die für die spätere Analyse herangezogenen HR-Kurven wurden in passende Abschnitte, mit einer Mindestlänge von 5 Minuten und einer Maximallänge von 20 Minuten, geschnitten. Pro Messzeitpunkt und Kalb wurden mehrerer Herzfrequenzkurvenstücke (Abschnitte), in unterschiedlicher Länge, geschnitten. Es ergaben sich pro Kalb maximal 4 Abschnitte. Beim Schneiden der jeweiligen Abschnitte, wurden Abschnitte mit mehr als 5 % Fehleranteil nicht herangezogen. Die prozentuellen Fehler je Minute wurden in einer Excel Tabelle erfasst. Die HR-Kurven Abschnitte wurden dann Mithilfe des Programmes Kubios HRV Software Version 2.1 (Department of Applied Physics University of Eastern Finland) für die weitere

Datenanalyse aufbereitet. Mithilfe von Kubios wurden folgende, für die weitere Analyse benötigten HRV-Parameter berechnet (Hagen et al., 2005):

HRV-Parameter der Zeitbereichsanalyse: RMSSD, SDNN und MEANHR

HRV-Parameter der Frequenzbereichsanalyse: LF-power (FFT) (in n.u), HF-power (FFT) (in n.u)

Nicht lineare Parameter: rprec, rpadet und rpshen

2.5 Beschreibung der Stichprobe

Von den vierzig beobachteten Kälbern konnten zwölf Kälber aufgrund von Ausfällen in der Videoaufzeichnung nicht in die Analyse eingeschlossen werden. Sechs weitere Kälber konnten aufgrund fehlender Herzfrequenzdaten an Tag 0 nicht eingeschlossen werden. Es verblieben somit 22 Kälber, die einen für die statistische Analyse ausreichenden Datensatz aufwiesen. Von den 22 Kälbern waren 7 weiblich (32 %) und 15 männlich (68 %). Das Geschlechterverhältnis war in den Behandlungsgruppen ISO, CLOVE und BURN mit 2 weiblichen Tieren und 4 männlichen Tieren gleich. In der Kontrollgruppe gab es 1 weibliches Tier und 3 männliche Tiere. An Tag 0 waren die Kälber im Mittel $43,4 \text{ kg} \pm 7,5 \text{ kg}$ schwer und an Tag 7 $50,0 \text{ kg} \pm 7,3 \text{ kg}$. Die vier Behandlungsgruppen waren bezüglich des Gewichts statistisch nicht signifikant unterschiedlich, sowohl an Tag 0 ($F(3, 17) = 0,539$, $p = 0,663$) als auch an Tag 7 ($F(3, 17) = 0,443$, $p = 0,725$). Die Verteilungen von Geschlecht, Alter sowie Gewicht wurde in Tab. 11 zusammengefasst.

Tabelle 11 Verteilung von Geschlecht, Alter und Gewicht auf die schlussendlich in die statistische Analyse eingegangenen Tiere der verschiedenen Behandlungsgruppen

Parameter		ISO⁷ (n = 6)	CLOVE⁸ (n = 6)	BURN⁹ (n = 6)	CON¹⁰ (n = 4)
<i>Geschlecht⁶</i>	männlich	4 (66,7 %)	4 (66,7 %)	4 (66,7 %)	3 (75,0 %)
	weiblich	2 (33,3 %)	2 (33,3 %)	2 (33,3 %)	1 (25,0 %)
<i>Alter in Tagen zu Messung 1</i>	MD ²	4,0	3,0	3,0	1,5
	Min ⁴	1	3	1	1
	Max ⁵	5	4	3	3
<i>Gewicht (kg) Tag 0</i>	MW ¹	40.7	43.6	46.3	42.8
	MD	39.5	43.0	46.0	43.0
	Std.-Abw. ³	3.83	7.47	10.91	6.95
	Min	37.0	37.0	33.0	35.0
	Max	47.0	55.0	61.0	50.0
<i>Gewicht (kg) Tag 7</i>	MW	49.2	49.6	47.9	53.3
	MD	51.3	50.8	48.0	51.0
	Std.-Abw.	5.36	5.89	8.00	10.99
	Min	39.5	39.0	40.0	42.5
	Max	54.0	56.5	55.5	66.0

¹MW = Mittelwert, ²MD = Median, ³Std.-Abw. = Standardabweichung, ⁴Min = Minimum, ⁵Max = Maximum

⁶Die Zahlen für die Variable Geschlecht sind absolute Häufigkeiten und Prozente in Klammern, ⁷ISO= Isoeugenol,

⁸CLOVE= Nelkenöl, ⁹BURN= Brennstab, ¹⁰CON= Kontrolle

2.6 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen betreffen folgende Parameter der HRV und HR: HR (Schläge/min), SDNN (ms), RMSSD (ms), RMSSD/SDNN, LF (Hz), HF (Hz), LF/HF, REC (%), DET (%), DET/REC. Im ersten Schritt wurden die einzelnen Messungen auf die Außentemperatur zum Zeitpunkt der Messung korrigiert. Die Korrektur erfolgte, indem zunächst eine Regression mit dem jeweiligen HRV – Parameter als Zielvariablen und der Temperatur als Prädiktorvariable gerechnet wurde; die Residuen dieser wurden danach zum Gesamtmittelwert des Parameters der HRV oder HR addiert. Im zweiten Schritt wurden die Messungen aggregiert, so dass pro Kalb und Tag nur eine Messung verblieb. Für die Aggregation wurden die einzelnen Messungen nach deren Dauer gewichtet. Im dritten Schritt wurden dann die Veränderungen zwischen Tag 1 und Tag 0 sowie zwischen Tag 7 und Tag 0 in den Parametern der HRV und HR errechnet, indem die Messwerte an Tag 0 von den Messwerten an Tag 1 beziehungsweise an Tag 7 subtrahiert wurden. Aus diesem Grund wurden nur Kälber in die Analyse einbezogen mit gültigen Messwerten an Tag 0 und mindestens einem weiteren Vergleichszeitpunkt, Tag 1 oder Tag 7. Unterschiede zwischen den vier Behandlungsgruppen bezüglich der Parameter der HRV und HR wurden mit varianzanalytischen Methoden ausgewertet (ANOVA). Alter, Gewicht und Geschlecht der Kälber wurden als Störfaktoren in die ANOVA-Berechnungen hinzugenommen. Es erfolgten jeweils separate ANOVAs für die Veränderungen zwischen Tag 1 und Tag 0 sowie für die Veränderungen zwischen Tag 7 und Tag 0. Die F-Statiken der ANOVAs und die dazugehörigen p-Werte werden berichtet. Bei signifikanten F-Tests in Bezug auf den Einfluss von Störfaktoren wurde die Richtung des statistischen Zusammenhangs zwischen dem signifikanten Störfaktor und dem Parameter der HRV und HR mit Hilfe von Produktmomentkorrelationen nach Pearson gerechnet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Eine Tendenz für einen Effekt wurde bis zu einem $p < 0,10$ interpretiert. Die Analysen erfolgten mit R Statistics, Version 4.0.

3 Ergebnisse

Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Behandlungsmethoden bezüglich der Parameter der HRV oder der HR ($p > 0,05$, Tab. 12). Es gab einen statistisch signifikanten Einfluss des Störfaktors Gewicht des Kalbs an Tag 7 sowohl auf die Veränderung von RMSSD ($F = 4,849$, $p = 0,045$) als auch auf die Veränderung von RMSSD/SDNN ($F = 6,494$, $p = 0,023$), sowie eine Tendenz für einen Einfluss auf DET/REC ($F = 3,861$, $p = 0,070$). Je schwerer das Kalb, desto höher war der Anstieg von RMSSD (Korrelation $r_{\text{Pearson}} = 0,466$, $p = 0,033$) und von RMSSD/SDNN ($r_{\text{Pearson}} = 0,588$, $p = 0,005$) an Tag 7 im Vergleich zu Tag 0. Je schwerer das Kalb, desto höher war die Abnahme von DET/REC an Tag 7 im Vergleich zu Tag 0 ($r_{\text{Pearson}} = -0,340$, $p = 0,131$). Es gab eine Tendenz für einen Einfluss des Alters des Kalbes an Tag 0 auf die Veränderung der HR zwischen Tag 0 und Tag 7 ($F = 4,115$, $p = 0,062$). Ältere Kälber hatten negativere HR-Differenzen an Tag 7 im Vergleich zu Tag 0; die Korrelation nach Pearson ergab $r = -0,446$, $p = 0,037$. Es gab eine Tendenz für einen Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Kälbern bezüglich der Veränderung der HR zwischen Tag 0 und Tag 7 ($F = 3,445$, $p = 0,085$). Ein t-Test bei unabhängigen Stichproben zeigte, dass die HR bei weiblichen Tieren zwischen Tag 0 und Tag 7 konstant blieb (Mittelwert $\text{Differenz} = 1,39$) und dass die HR bei männlichen Tieren im Laufe der Zeit sank (Mittelwert $\text{Differenz} = -10,74$, $t(20) = 2,365$, $p = 0,028$). In Tab. 13 werden die Messwerte der Parameter der HRV und HR zusammengefasst über alle Tiere zu den drei Messzeitpunkten (Tag 0, Tag 1 und Tag 7) als Mittelwert und Standardabweichung wiedergegeben. Je Kalb und je Messzeitpunkt wurden die Werte der einzelnen Sequenzen vorab gemittelt. Es handelt sich um Mittelwerte und Standardabweichungen der nicht auf Außentemperatur korrigierten Werte. Mithilfe von Boxplots werden die Veränderungen der Parameter der HRV und der HR getrennt für jede Behandlungsgruppe grafisch dargestellt. Die Veränderungen errechneten sich als Wert an Tag 1 minus dem Wert an Tag 0, beziehungsweise als Wert an Tag 7 minus Wert an Tag 0 (Abb. 1 bis zum Abb. 4).

Tabelle 12 Ergebnisse der ANOVAs für die Differenzen der Parameter der HRV und HR zwischen Tag 1 und Tag 0 sowie zwischen Tag 7 und Tag 0 mit Behandlungsgruppe, Geschlecht, Alter an Tag 0 und Gewicht an Tag 7

Zielvariable	Tag	Einflussvariable	Df ¹	SumSq ²	F-Wert	P-Wert
<i>HR³</i>						
<i>(Schläge/min)</i>	Tag 1 – Tag 0	Behandlung	3	368,44	1,314	0,315
		Geschlecht	1	31,05	0,332	0,575
		Alter (Tag 0)	1	227,85	2,437	0,145
		Gewicht (Tag 7)	1	128,3	1,372	0,264
	Tag 7 – Tag 0	Behandlung	3	239,69	0,694	0,571
		Geschlecht	1	396,81	3,445	0,085^t
		Alter (Tag 0)	1	474,07	4,115	0,062^t
		Gewicht (Tag 7)	1	96,03	0,834	0,377
<i>SDNN⁴</i>						
<i>(Schläge/min)</i>	Tag 1 – Tag 0	Behandlung	3	372,98	0,790	0,522
		Geschlecht	1	13,05	0,083	0,778
		Alter (Tag 0)	1	1,85	0,012	0,916
		Gewicht (Tag 7)	1	258,2	1,642	0,224
	Tag 7 – Tag 0	Behandlung	3	1210,46	1,438	0,274
		Geschlecht	1	188,12	0,670	0,427
		Alter (Tag 0)	1	280,15	0,998	0,335
		Gewicht (Tag 7)	1	607,02	2,163	0,164
<i>RMSSD⁵ (ms)</i>						
	Tag 1 – Tag 0	Behandlung	3	195,28	0,435	0,732
		Geschlecht	1	5,23	0,035	0,855
		Alter (Tag 0)	1	2,83	0,019	0,893
		Gewicht (Tag 7)	1	378,49	2,530	0,138
	Tag 7 – Tag 0	Behandlung	3	2566,28	2,244	0,128
		Geschlecht	1	219,72	0,576	0,460
		Alter (Tag 0)	1	577,70	1,515	0,239
		Gewicht (Tag 7)	1	1848,77	4,849	0,045*
<i>RMSSD/SDNN</i>						
	Tag 1 – Tag 0	Behandlung	3	0,051	0,318	0,812
		Geschlecht	1	0,016	0,305	0,591
		Alter (Tag 0)	1	0,002	0,033	0,859
		Gewicht (Tag 7)	1	0,134	2,493	0,140
	Tag 7 – Tag 0	Behandlung	3	0,141	0,681	0,578
		Geschlecht	1	0,012	0,177	0,681
		Alter (Tag 0)	1	0,00003	0,0004	0,984
		Gewicht (Tag 7)	1	0,449	6,494	0,023*
<i>LF⁶ (Hz)</i>						
	Tag 1 – Tag 0	Behandlung	3	147,251	0,122	0,946
		Geschlecht	1	0,186	0,001	0,983
		Alter (Tag 0)	1	72,704	0,180	0,679
		Gewicht (Tag 7)	1	10,828	0,027	0,873
	Tag 7 – Tag 0	Behandlung	3	1291,82	0,610	0,619
		Geschlecht	1	55,71	0,079	0,783
		Alter (Tag 0)	1	521,48	0,739	0,404
		Gewicht (Tag 7)	1	39,91	0,057	0,816

Fortsetzung Tab. 12

Zielvariable	Tag	Einflussvariable	Df ¹	SumSq ²	F-Wert	P-Wert	
<i>HF⁷ (Hz)</i>							
	Tag 1 – Tag 0	Behandlung	3	149,87	1,393	0,293	
		Geschlecht	1	11,84	0,330	0,576	
		Alter (Tag 0)	1	96,088	2,678	0,128	
		Gewicht (Tag 7)	1	2,733	0,076	0,787	
	Tag 7 – Tag 0	Behandlung	3	63,93	0,465	0,711	
		Geschlecht	1	42,22	0,921	0,353	
		Alter (Tag 0)	1	84,24	1,838	0,197	
		Gewicht (Tag 7)	1	82,81	1,807	0,200	
	<i>REC⁸ (%)</i>						
	Tag 1 – Tag 0	Behandlung	3	207,550	0,829	0,503	
		Geschlecht	1	224,931	2,695	0,127	
		Alter (Tag 0)	1	28,218	0,338	0,572	
Gewicht (Tag 7)		1	248,545	2,978	0,110		
Tag 7 – Tag 0	Behandlung	3	447,500	0,764	0,533		
	Geschlecht	1	183,120	0,938	0,349		
	Alter (Tag 0)	1	0,930	0,005	0,946		
	Gewicht (Tag 7)	1	440,610	2,256	0,155		
<i>DET⁹ (%)</i>							
	Tag 1 – Tag 0	Behandlung	3	0,052	0,096	0,961	
		Geschlecht	1	0,063	0,348	0,566	
		Alter (Tag 0)	1	0,042	0,235	0,637	
		Gewicht (Tag 7)	1	0,484	2,692	0,127	
	Tag 7 – Tag 0	Behandlung	3	0,816	0,566	0,646	
		Geschlecht	1	0,191	0,398	0,538	
		Alter (Tag 0)	1	0,060	0,125	0,729	
		Gewicht (Tag 7)	1	1,443	3,004	0,105	
<i>DET/REC</i>							
	Tag 1 – Tag 0	Behandlung	3	0,529	1,328	0,311	
		Geschlecht	1	0,353	2,658	0,129	
		Alter (Tag 0)	1	0,008	0,062	0,808	
		Gewicht (Tag 7)	1	0,382	2,882	0,115	
	Tag 7 – Tag 0	Behandlung	3	1,164	1,400	0,284	
		Geschlecht	1	0,269	0,970	0,341	
		Alter (Tag 0)	1	0,110	0,398	0,538	
		Gewicht (Tag 7)	1	1,070	3,861	0,070^t	

¹ Freiheitsgrade; ² Summe der quadrierten Abweichungen; Fett markierte Werte sind statistisch signifikant, * p < 0,05, ^t p < 0,10, ³HR= heart rate, ⁴SDNN= Standard Deviation of the NN Interval, ⁵RMSSD= Root Mean Square of Successive Differences, ⁶LF= Low Frequency, ⁷HF= High Frequency, ⁸REC= recurrence rate, ⁹DET= determinism

Tabelle 13 Mittelwert \pm Standardabweichung der Parameter der HRV und der HR der in die statistische Analyse eingegangenen Tiere getrennt für die verschiedenen Behandlungsgruppen

Zielvariable	Tag	ISO ⁸ (n = 6)	CLOVE ⁹ (n = 6)	BURN ¹⁰ (n = 6)	CON ¹¹ (n = 4)
<i>HR¹</i> (Schläge/min)	0	138,5 \pm 23,14	130,7 \pm 14,18	128,9 \pm 10,33	119,5 \pm 12,53
	1	141,5 \pm 26,36	138,1 \pm 11,68	135,7 \pm 15,26	125,6 \pm 20,11
	7	127,6 \pm 24,35	124,3 \pm 8,11	123,7 \pm 21,00	115,4 \pm 20,67
<i>SDNN²</i> (Schläge/min)	0	25,9 \pm 10,51	25,2 \pm 15,16	27,9 \pm 11,10	27,8 \pm 11,97
	1	25,9 \pm 11,38	19,0 \pm 3,81	25,6 \pm 6,50	27,3 \pm 8,33
	7	30,7 \pm 18,70	18,1 \pm 5,21	37,2 \pm 11,65	39,1 \pm 23,63
<i>RMSSD³</i> (ms)	0	8,5 \pm 3,78	13,4 \pm 18,55	9,2 \pm 2,40	17,0 \pm 15,63
	1	9,3 \pm 5,77	7,4 \pm 1,78	9,9 \pm 6,07	8,8 \pm 4,93
	7	16,0 \pm 15,26	5,3 \pm 2,56	25,5 \pm 27,18	33,6 \pm 38,6
<i>RMSSD/SDNN</i>	0	0,38 \pm 0,21	0,44 \pm 0,30	0,36 \pm 0,10	0,56 \pm 0,34
	1	0,38 \pm 0,15	0,4 \pm 0,11	0,39 \pm 0,21	0,33 \pm 0,14
	7	0,45 \pm 0,18	0,31 \pm 0,13	0,57 \pm 0,48	0,63 \pm 0,49
<i>LF⁴</i> (Hz)	0	168,4 \pm 143,84	223,2 \pm 280,84	216,3 \pm 153,49	257,9 \pm 271,31
	1	259,1 \pm 194,58	100,4 \pm 44,10	221,1 \pm 116,91	169,1 \pm 71,90
	7	480,0 \pm 654,80	77,0 \pm 44,76	750,5 \pm 891,14	1187,5 \pm 1692,0
<i>HF⁵</i> (Hz)	0	10,4 \pm 12,66	45,4 \pm 99,65	13,7 \pm 6,59	41,9 \pm 43,09
	1	12,3 \pm 11,98	8,2 \pm 7,52	15,3 \pm 14,81	13,9 \pm 12,78
	7	39,0 \pm 56,22	2,5 \pm 2,09	163,2 \pm 251,81	182,2 \pm 280,21
<i>LF/HF</i>	0	24,9 \pm 18,12	26,9 \pm 25,28	19,5 \pm 12,58	16,1 \pm 16,79
	1	34,6 \pm 24,48	23,8 \pm 8,86	26,5 \pm 22,10	23,0 \pm 20,10
	7	27,3 \pm 29,58	45,0 \pm 37,70	38,4 \pm 39,30	23,4 \pm 21,53
<i>REC⁶</i> (%)	0	58,8 \pm 12,11	55,0 \pm 7,74	58,0 \pm 3,14	57,5 \pm 5,15
	1	56,4 \pm 6,03	60,4 \pm 6,84	55,7 \pm 8,43	58,7 \pm 6,81
	7	54,6 \pm 13,16	59,8 \pm 6,41	54,5 \pm 11,84	53,9 \pm 16,38
<i>DET⁷</i> (%)	0	99,6 \pm 0,77	99,6 \pm 0,47	99,8 \pm 0,11	99,5 \pm 0,30
	1	99,7 \pm 0,37	99,7 \pm 0,24	99,6 \pm 0,45	99,8 \pm 0,16
	7	99,5 \pm 0,42	99,8 \pm 0,14	99,3 \pm 1,05	99,2 \pm 0,99
<i>DET/REC</i>	0	4,3 \pm 0,57	4,1 \pm 0,28	4,2 \pm 0,17	4,1 \pm 0,23
	1	4,2 \pm 0,25	4,4 \pm 0,32	4,2 \pm 0,46	4,3 \pm 0,28
	7	4,1 \pm 0,51	4,4 \pm 0,28	4,1 \pm 0,60	4,1 \pm 0,77

¹HR= heart rate, ²SDNN=Standard Deviation of RR-Intervals, ³RMSSD= Root Mean Square of Successive Differences, ⁴LF=low frequency, ⁵HF=high frequency, ⁶REC=reccurence rate, ⁷DET=determinism, ⁸ISO= Isoeugenol, ⁹CLOVE=Nelkenöl, ¹⁰BURN=Brennstab, ¹¹CON=Kontrolle

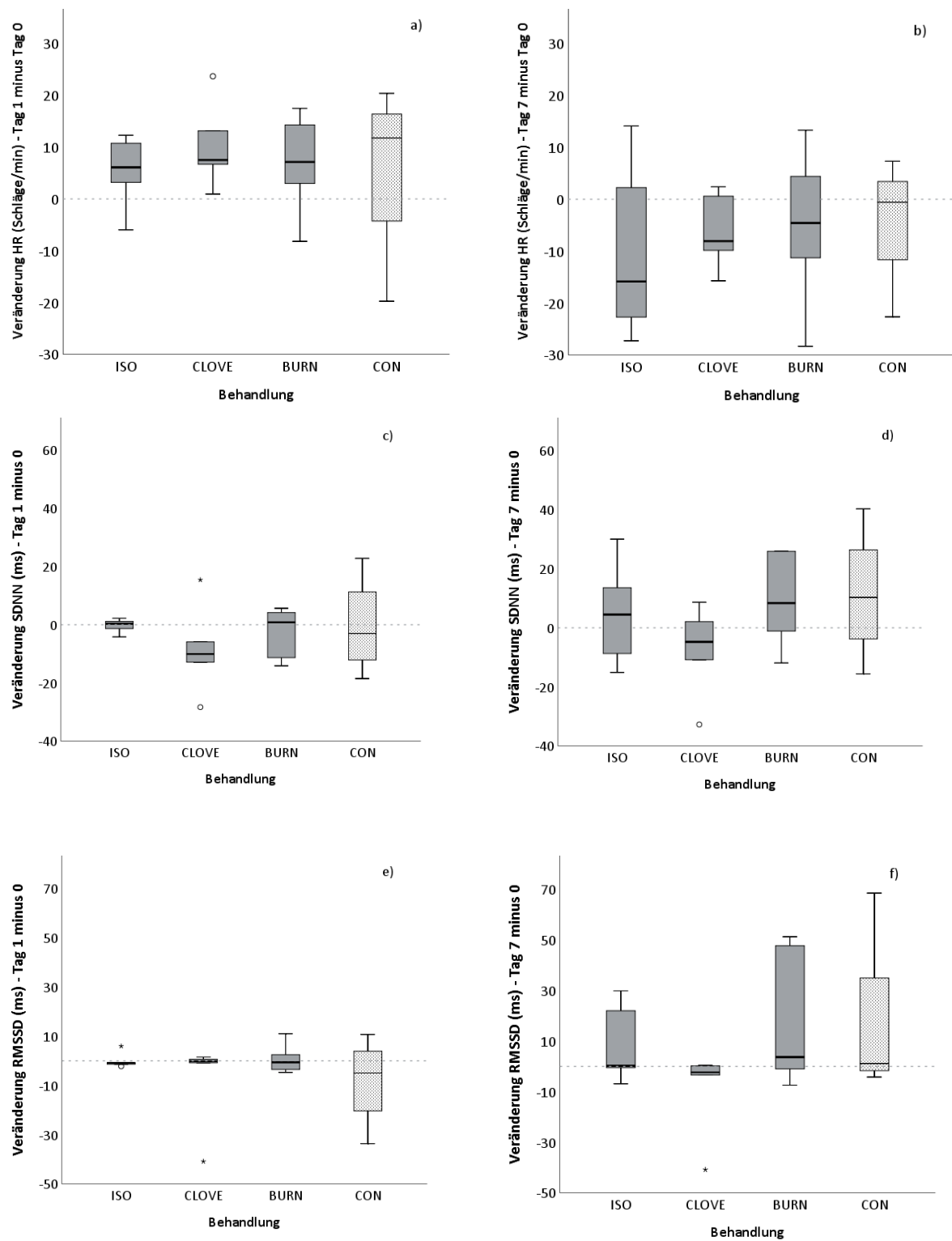


Abb. 1. Boxplots der Veränderungen zwischen Tag 1 und Tag 0 sowie zwischen Tag 7 und Tag 0 für die Parameter HR= heart rate (a, b), SDNN= Standard Deviation of RR-Intervals (c, d), RMSSD= Root Mean Square of Successive Differences (e, f), ISO= Isoeugenol, CLOVE= Nelkenöl, BURN= Brennstab, CON= Kontrolle (a-f)

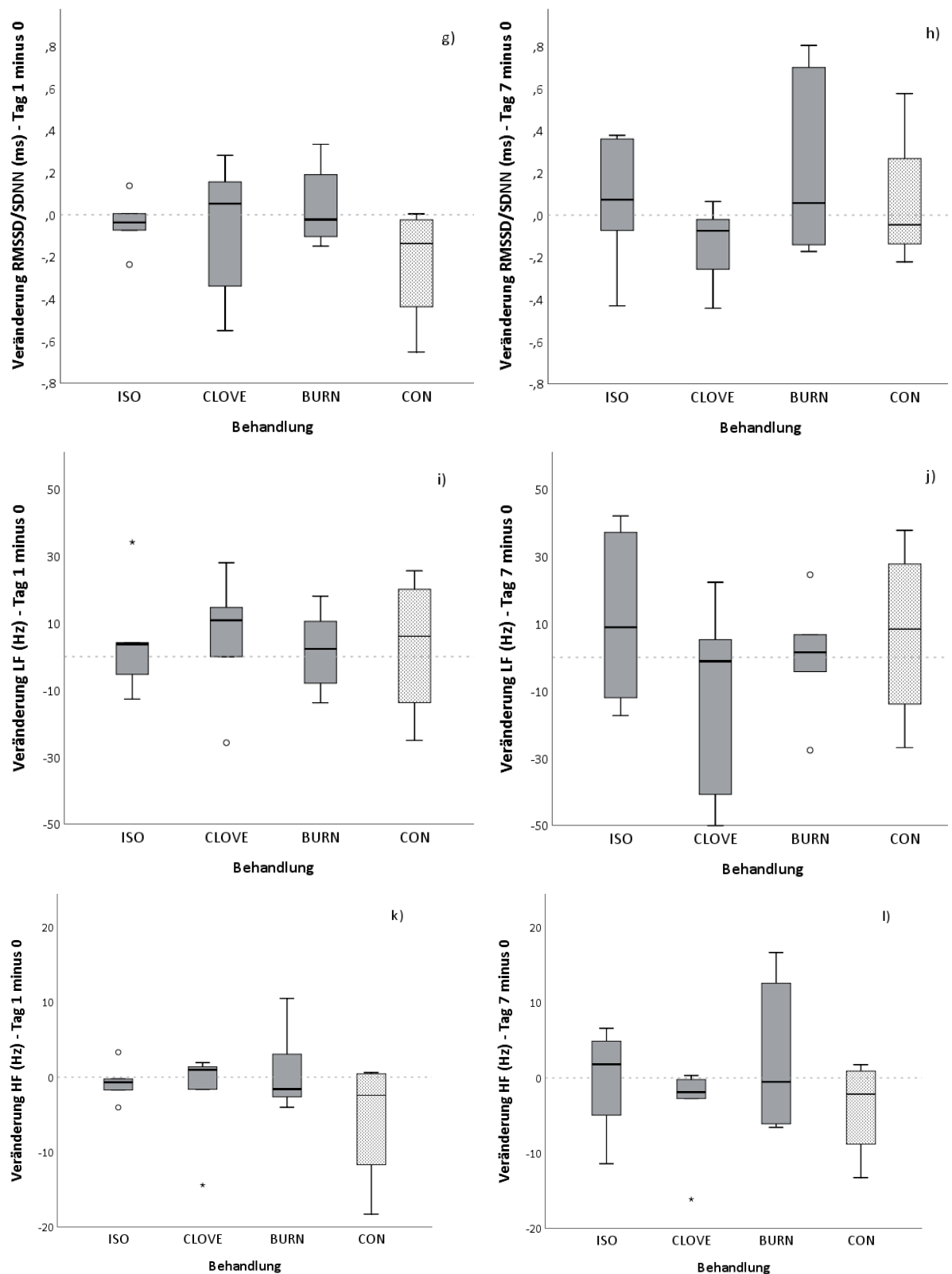


Abb. 2. Boxplots der Veränderungen zwischen Tag 1 und Tag 0 sowie zwischen Tag 7 und Tag 0 für die Parameter RMSSD= Root Mean Square of Successive Differences /SDNN= Standard Deviation of RR-Intervals (g, h), LF= low frequency (i, j), HF= high frequency (k, l), ISO= Isoeugenol, CLOVE= Nelkenöl, BURN= Brennstab, CON= Kontrolle (g-l)

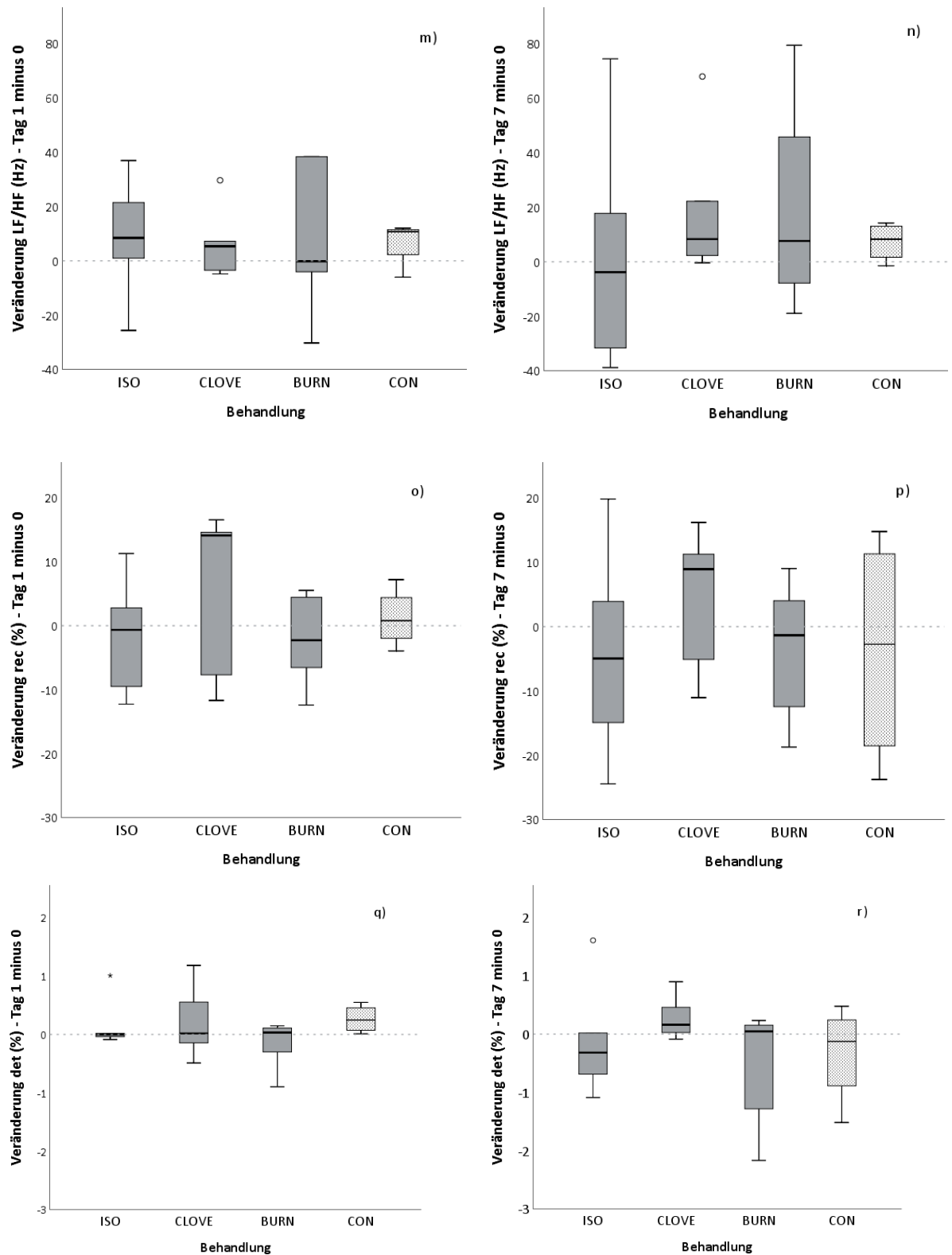


Abb. 3. Boxplots der Veränderungen zwischen Tag 1 und Tag 0 sowie zwischen Tag 7 und Tag 0 für die Parameter LF= low frequency /HF= = high frequency (m, n), REC= recurrence rate (o, p), DET= determinism (q, r), ISO= Isoeugenol, CLOVE= Nelkenöl, BURN= Brennstab, CON= Kontrolle (m-r)

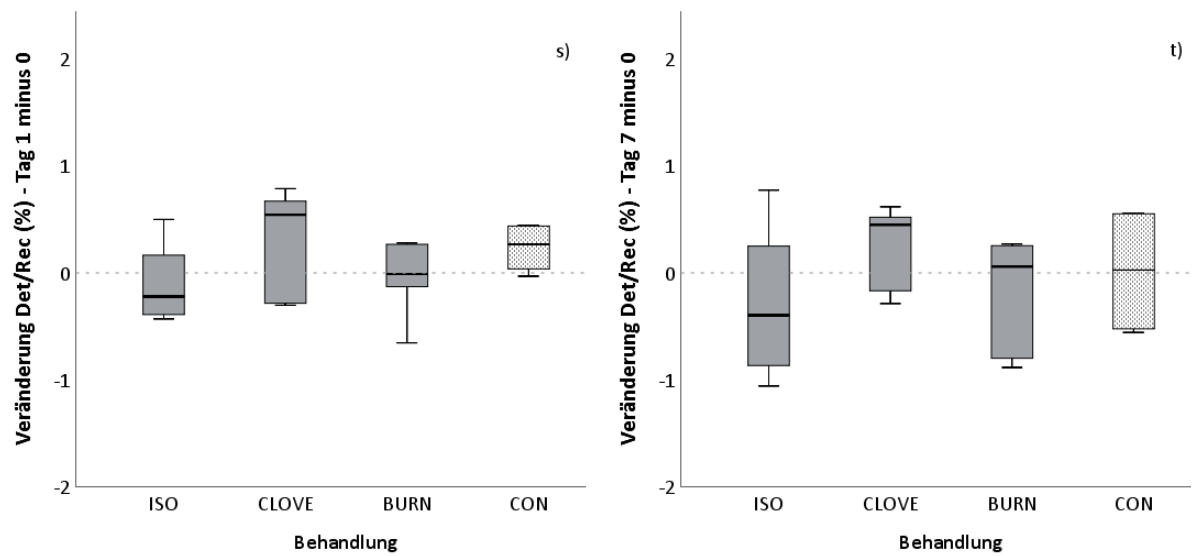


Abb. 4. Boxplots der Veränderungen zwischen Tag 1 und Tag 0 sowie zwischen Tag 7 und Tag 0 für die Parameter DET= determinism /REC= recurrence rate (s, t), ISO= Isoeugenol, CLOVE= Nelkenöl, BURN= Brennstab, CON= Kontrolle (s, t)

4 Diskussion

In der vorliegenden Diplomarbeit wurde erstmals der Effekt, den eine Injektion mit Isoeugenol unter die Hornanlage, eine mögliche Alternative zur thermischen Enthornung von Kälbern, auf die HRV hat, evaluiert. Damit die Belastung, welche auf die Tiere wirkt, ermittelt werden konnte, wurden die Zwischenschlagintervalle der Kälber vor, während und nach der Enthornung erhoben und basierend darauf, wurden die HR und HRV als Indikator für das Wohlbefinden der Tiere analysiert. Bezogen auf die HR und HRV, gab es keine Unterschiede zwischen den vier Behandlungsgruppen oder bezogen auf die Messzeitpunkte, bei Einzeltierbetrachtung innerhalb der jeweiligen Gruppe. Der Messzeitpunkt hat somit keinen Einfluss auf die HR oder die HRV. Die Hypothese, dass eine Injektion mit Nelkenöl oder Isoeugenol zu einer geringeren Einschränkung des Wohlbefindens führt als die thermische Enthornung konnte anhand der HR und der HRV nicht bestätigt werden. Genauso ergab sich kein signifikanter Unterschied der HR oder HRV zwischen der Kontrollgruppe, welche mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt wurde und jenen Kälbern, die Nelkenöl bzw. Isoeugenol erhielten. Somit konnte auch die zweite Hypothese, dass eine Injektion mit Nelkenöl bzw. Isoeugenol zu einer höheren Einschränkung des Wohlbefindens gegenüber einer Injektion mit physiologischer Kochsalzlösung führt, anhand der HR und der HRV, nicht bestätigt werden. In einer Studie von Huber et al. (2013), in der untersucht wurde welchen Effekt die Gabe von Flunixin meglumine (NSAID) vor der Enthornung auf die Serum-Kortisolkonzentration der Kälber hat, wurden ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse in der HR festgestellt. Hier muss erwähnt werden, dass ein direktes Vergleichen der Studien schwer ist, da die Ermittlung der HR nicht auf dieselbe Weise wie in unserem Versuch, sondern lediglich durch Auskultation, stattgefunden hat und die Fragestellung der Studie, nämlich die Wirksamkeit von NSAID bzw. welchen Effekt Flunixin meglumine auf die Serum-Kortisolkonzentration hat, ebenso nicht dieselbe war. Die Aufzeichnung der HR beschränkte sich bei Huber et al. (2013) auf den Tag der Enthornung. In einer Diplomarbeit aus dem Jahre 2011 (Nöbauer, 2011) wurde ebenfalls die HRV als Indikator für das Wohlbefinden der Kälber nach der Enthornung analysiert. Die Diplomarbeit von Nöbauer und die Publikation von Huber et al. (2013) sind Teile eines gemeinsamen Versuches. Fragestellung war, welchen Effekt die Gabe von Flunixin nach der Enthornung auf die HRV der Kälber hat. Es gab 4 Gruppen, 3 davon wurden enthornt und eine Gruppe diente als Kontrollgruppe, die weder enthornt noch behandelt wurde. Alle Gruppen die

enthornt wurden, erhielten vor der Enthornung ein LA und dann, je nach Zugehörigkeit zur jeweiligen Behandlungsgruppe entweder zweimalig Flunixin, einmalig Flunixin und statt der zweiten Flunixin Gabe physiologische Kochsalzlösung (NaCl) oder anstelle der zweimaligen Flunixin Gabe, zweimal NaCl. Die Kontrollgruppe erhielt, wie bereits oben erwähnt, keine Injektion. Beim Vergleich der Behandlungsgruppen ergab sich, beim varianzanalytischen Vergleich der Änderung der Mittelwerte, im Zeitfenster 9-11 Stunden nach der Enthornung zum Vortag ohne Kontrollgruppe, ein signifikanter Unterschied im HRV-Parameter Trend (Nöbauer, 2011). Die Gruppe 3 (Flunixin+Flunixin) wies einen höheren Wert im Parameter Trend auf als Gruppe 2 (NaCl+NaCl) und Gruppe 1 (Flunixin+NaCl) (Nöbauer, 2011). Der Trend gibt Auskunft darüber, ob sich die Variabilität verbessert oder verschlechtert (Annunzio, 2017). Zusätzlich gab es beim Vergleich aller vier Gruppen also inklusive Kontrollgruppe eine starke Tendenz für einen Unterschied im selben HRV-Parameter (Trend) wie beim Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander. Generell wurde ein steigender Wert bei den Tieren der Gruppe 3 (Flunixin + Flunixin) festgestellt und ein Abfall in Gruppe 1 (Flunixin + NaCl) und Gruppe 2 (NaCl + NaCl) (Nöbauer, 2011). Die Gruppen unterschieden sich außerdem in der HR und tendenziell in LF und det/rec. Die Analyse des HRV Parameters LF zeigte, dass jüngere Tiere höhere Werte im Vergleich zu älteren Tieren hatten (Nöbauer, 2011). Auch die Analyse der HR ergab bei jüngeren Kälbern eine geringere Veränderung der HR verglichen mit älteren Kälbern. Im Parameter det/rec zeigte Gruppe 2 (NaCl + NaCl) im Vergleich zur Kontrollgruppe jeweils den niedrigsten Wert (Nöbauer, 2011).

Eine weitere Studie aus dem Jahre 2008 von Stewart et al. (2008), beschäftigte sich ebenfalls mit der Möglichkeit, Schmerzen, durch Analyse der HRV-Parameter zu erkennen, wobei auch in dieser Studie die Aufzeichnung der HRV auf den Tag der Enthornung beschränkt war. Das Zeitfenster in dem die Messungen erhoben wurden (Stewart et al., 2008) betrug 40 Minuten, diese Tatsache macht einen direkten Datenvergleich ebenfalls schwierig. Im Versuch von Stewart et al. (2008) konnte ein signifikanter Anstieg der HR innerhalb der ersten 5 Minuten nach thermischer Enthornung ohne LA festgestellt werden. Bei den Tieren, die ohne LA thermisch enthornt wurden, blieb diese Erhöhung über die gesamte Versuchsdauer bestehen. Das LF/HF Ratio stieg in derselben Zeit nur bei Tieren, welche ohne LA enthornt wurden, an. Diese Ergebnisse sind mit den Ergebnissen unserer Studie zwar nicht direkt vergleichbar, da dieser Anstieg eine akute Reaktion auf den Eingriff selbst ist, sprechen aber dafür, dass die HR allein nicht ausreicht, um Stress in Form von Schmerzen einzustufen oder zu beurteilen. Die

erhöhten Werte des LF/HF Ratio sprechen dafür, dass dieser HRV-Parameter deutlich spezifischer ist und somit zur Beurteilung und Einstufung von Stress wesentlich geeigneter ist. Eine der ersten Studien die die HR als Indikator für Schmerzen oder Stress während und nach der Enthornung evaluierten war von Grøndahl-Nielsen et al. (1999). In der Studie wurde das Verhalten, die Plasma-Kortisol-Konzentration und die Herzfrequenz bei 4-6 Wochen alten, männlichen und weiblichen Kälbern, während und nach der Enthornung untersucht. Sechs unterschiedliche Behandlungsmethoden wurden dabei evaluiert. Gruppe eins und zwei erhielt lokal einen beidseitigen Hautnervenblock (Lignocaine 2 %) und wurde scheinenthornt oder mit dem elektrischen Kauter enthornt. Gruppe drei und vier erhielt eine Sedierung (Xylazin und Butorphanol) und ein Analgetikum (Butorphanol), Gruppe vier noch zusätzlich wie die ersten beiden Gruppen einen Hautnervenblock und wurde 15 Minuten später mit dem elektrischen Kauter enthornt. Gruppe fünf wurde ohne Sedierung und Analgesie enthornt und Gruppe sechs erhielt keinerlei Behandlung und diente als Kontrollgruppe (Grøndahl-Nielsen et al., 1999). Gruppe fünf hatte für ungefähr 213 Minuten nach Enthornung, eine signifikant höhere Herzfrequenz als Gruppe eins. Zwischen Gruppe eins (Nervenblock + Scheinenthornt) und zwei (Nervenblock + elektrischer Kauter) gab es, ähnlich wie in unserer Studie, keine signifikanten Unterschiede in der HR (Grøndahl-Nielsen et al., 1999). Gruppe drei und vier hatte für ungefähr 90 Minuten nach dem Eingriff eine deutlich niedrigere HR als Gruppe eins. Diese Ergebnisse wurden erwartet, da sich die verabreichten Sedativa auf die HR auswirken, weshalb die Autoren in der Studie auch darauf hinweisen, dass bei Gabe von Sedativa die HR kein adäquater Parameter ist, um sie für die Analyse von Schmerzen heranzuziehen. (Grøndahl-Nielsen et al., 1999). Der Effekt von Medikamenten auf die HR und HRV wird in verschiedenen Studien beschrieben (Després et al., 2002). Da der Beobachtungszeitraum, mit einmalig 4 Stunden am Enthornungstag, deutlich kürzer war als der Beobachtungszeitraum in unserer Studie, ist ein direkter Vergleich der Studien schwierig. Jedoch könnte es sein, dass allein die Manipulation der Kälber als Stressor ausreicht, um die HR zu steigern und deswegen keine Unterschiede in den verschiedenen Gruppen feststellbar war.

In der vorliegenden Diplomarbeit gab einen Einfluss des Gewichts des Kalbes auf die Veränderung der HRV-Parameter der Zeitbereichsanalyse. Je schwerer das Kalb, desto höher war der Anstieg von RMSSD im Vergleich von Tag 0 zu Tag 7. Dies stimmt mit den Ergebnissen einer früheren Studie von Hagen et al. (2005) überein. In der Studie wurden die

HRV Parameter bei Kühen unterschiedlicher Rasse (Fleckvieh und Braunvieh), im Stehen, Liegen und beim Melken in zwei unterschiedlichen Melksystemen analysiert. Die Ergebnisse der Studie zeigten einen Effekt des Gewichtes der Tiere auf die HR und HRV-Parameter des Zeitbereichs. Zusätzlich zum Gewicht, zeigten die Ergebnisse desselben Versuchens einen Einfluss der Rasse und Tageszeit auf die HR und HRV-Parameter (Hagen et al., 2005). Die Kovariaten Körpergewicht, Tageszeit und Rasse waren statistisch signifikant. Die mittlere HR nahm im Laufe des Tages zu, während RMSSD und HFnorm abnahmen. Je schwerer das Tier, desto höher war die mittlere HR, LF/HF und die deterministischen Anteile des nichtlinearen Bereichs (Hagen et al., 2005). Das Alter der Kälber hatte in unserem Versuch ebenfalls Einfluss auf die Veränderung der HR zwischen Tag 7 und Tag 0. Ältere Kälber hatten negativere HR-Differenzen an Tag 7 verglichen mit Tag 0. Auch in der Diplomarbeit von Nöbauer (2011) hatte das Alter einen Einfluss auf die Parameter HR und LF. Jüngere Kälber zeigten geringere Änderungen in der HR nach der Enthornung also einen niedrigeren Anstieg der HR und höhere Werte im HRV-Parameter LF (Nöbauer, 2011). Auch in einer Studie von Van Reenen et al.(2005), in der die Reaktion von Kälbern auf akuten Stress analysiert wurde, nahmen die Reaktionen, in Form einer niedrigeren Herzfrequenz, auf die durchgeführten Tests mit dem Alter der Kälber ab. Dies bedeutet, dass die HR bei älteren Kälbern niedriger war also mit dem Alter abnahm. Der Einfluss von Kovariaten in Form von Störfaktoren auf die HRV wurde auch von Stock et al. (2013) beschrieben.

Auf Grund technischen Gebrechens wie Ausfälle in der Videoaufzeichnung, Störungen der HR-Aufnahmen oder dass die Kälber im zuvor definierten Zeitbereich nicht frei von Störungen, Manipulationen oder sonstigen äußeren Einflüssen waren und den daraus resultierenden Ausfällen bei der Datensammlung, war die Stichprobenanzahl deutlich geringer als geplant. Aufgrund der kleinen Stichprobe (22 Kälber) haben statistische Verfahren nur eine geringe Power. Dies könnte zur Folge gehabt haben, dass eventuell vorhandene Unterschiede zu klein waren, um statistisch signifikante Ergebnisse zu erlangen. Da externe Störfaktoren wie Alter, Geschlecht, Gewicht oder generell Störung durch Dritte nie komplett eliminiert werden können, kann die Kombination aus geringer Stichprobe und äußeren Einflüssen, ebenfalls dazu beigetragen haben, dass in der vorliegenden Untersuchung keine signifikanten Ergebnisse ermittelt werden konnten. Mohr et al. (2002) beschreibt in seiner Studie eine Veränderung der HRV-Parameter aufgrund von Belästigung durch Insekten oder Durchfall der Tiere. Obwohl wir darauf geachtet haben, dass ausschließlich gesunde bzw. klinisch unauffällige Tiere an

unserem Versuch teilnehmen, veranschaulicht diese Studie gut, dass schon geringe endogene Veränderungen oder externe Einflüsse, Auswirkungen auf die HR und HRV haben. Eventuell waren auch die Manipulation der Kälber und die Direktbeobachtung an sich schon Stressor genug, um Erhöhungen in allen Gruppen auszulösen und deswegen keine Unterschiede in den Ergebnissen gefunden werden konnte. Diese Thematik beschreibt Ina Gaude in ihrer Dissertation (Gaude, 2014). Die Ergebnisse ihres Versuchs zeigten eine Erhöhung der mittleren HR bei Fixierung der Tiere und bei der Blutabnahme. Obwohl bei Auswahl der zu analysierenden Daten darauf geachtet wurde, dass nur Abschnitte gewählt wurden, welche frei von Manipulation durch den Beobachter oder externen Störung (Futter, Behandlung Nachbarkalb, Studenten, ...) waren, kann man, bedingt durch das gehäufte wenn auch nicht invasive Handling vor allem an Tag 0, einen Einfluss dieser gerade eben genannten Faktoren auf die HR und HRV nicht ausschließen. Zu einer ähnlichen Erkenntnis kamen Hagen et al. (2005) in ihrer Studie, jedoch konnte in diesem Versuch keine Erhöhung der mittleren HR, sondern ein Effekt in den etwas spezifischeren Parametern der HRV festgestellt werden. Dies bestätigt einerseits den Nutzen der HRV-Analyse und andererseits, dass eine HR-Analyse allein eher zu ungenau oder besser gesagt, zu unspezifisch zur Beurteilung von Stress ist und die HR und HRV-Parameter immer gemeinsam analysiert werden sollten. Dass die HRV ein idealer und wertvoller Parameter ist um als physiologischer Indikator für die Stressbelastung bei Kälbern zu fungieren wurde auch in der Studie von Mohr et al (2002), in der die Nützlichkeit der HRV und ihrer spezifischen Parameter zur Evaluierung von Stress bewertet wurden, bestätigt. Zusammenfassend ergab die Analyse der Herzfrequenz und Herzfrequenzvariabilität keine Hinweise auf Unterschiede in der Reaktion des autonomen Nervensystems auf die verschiedenen Behandlungen und damit keine Hinweise auf Unterschiede im Wohlbefinden anhand dieses Parameters. Für eine abschließende Beurteilung des Wohlbefindens sind die weiteren Parameter des Projektes mit heranzuziehen.

5 Zusammenfassung

Die Enthornung von Kälbern ist ein häufig durchgeführter Eingriff in der Rinderhaltung. Die vorliegende Diplomarbeit beschäftigte sich mit der Fragestellung, welchen Einfluss die gewählte Methode der Enthornung auf die Herzfrequenzvariabilität (HRV) der Kälber, als Indikator für Wohlbefinden, hat und um in weiterer Folge, Rückschlüsse auf die Schmerzhaftigkeit des jeweiligen Eingriffes ziehen zu können. Die Studie erfolgte mit 40 Kälbern, die zufällig einer von vier unterschiedlichen Behandlungsgruppen zugeteilt wurden. Neben einer Injektion mit 1,5 ml Isoeugenol oder Nelkenöl unter jede Hornknospe als alternative Methode der Enthornung wurde die thermische Enthornung mit dem Brennstab (mit Sedation und Lokalanästhesie) sowie einer Injektion mit 1,5 ml physiologischer Kochsalzlösung unter jede Hornknospe als Kontrollgruppe untersucht. Aufgrund technischer Ausfälle konnten nach der Datenaufbereitung lediglich 29 der insgesamt 40 am Versuch teilnehmenden Tiere für die HRV Analyse herangezogen werden, in die statistische Analyse gelangten 22 Tiere. Die Herzfrequenz wurde vor, und nach dem jeweiligen Eingriff, an Tag 0, an Tag 1, Tag 3 und Tag 7, für jeweils 8 (Tag 0 und 1) bzw. 4 Stunden (Tag 3 und 7) mittels Elektrodengürtel und Sensor der Firma Polar® aufgezeichnet, mit dem Programm Polar Precision Performance SW von Polar® bearbeitet und im Anschluss daran mit Hilfe der Software Kubios die HRF Parameter berechnet. Die Auswertung und Bearbeitung der Daten erfolgte verblindet. Es wurden nur Daten mit Abschnitten von Tieren in Ruhe, definiert durch ein liegendes Kalb frei von Störung oder Manipulation, und Abschnitte mit weniger als 5% Fehler pro Minute in der aufgezeichneten Herzfrequenzkurve verwendet und ausgewertet. In keinem der analysierten HRV-Parameter (aus Zeitbereich, Frequenzbereich und nicht-linearen Parametern) oder der Herzfrequenz gab es Unterschiede zwischen den vier Behandlungsgruppen. Die Hypothesen, dass die höchste HRV nach dem Eingriff bei, der mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppe beziehungsweise die geringste HRV, bei der mit dem Brennstab enthornten Gruppe liegt und dass die beiden anderen Gruppen dazwischenliegen, konnten nicht bestätigt werden. Der durch Ausfälle in der Videoaufzeichnung und Störungen der Herzfrequenz-Aufnahmen bedingte geringe Stichprobenumfang könnte einer der Gründe hierfür sein. Andere Störfaktoren wie Alter, Geschlecht, Rasse oder Gewicht der Kälber oder unterschiedliche Umgebungstemperaturen könnten dieses Problem trotz Berücksichtigung in der statistischen Analyse noch verstärkt

haben. Zusammenfassend ergab die Analyse der Herzfrequenz und Herzfrequenzvariabilität keine Hinweise auf Unterschiede in der Reaktion des autonomen Nervensystems auf die verschiedenen Behandlungen. Für eine Beurteilung des Wohlbefindens sind die weiteren Parameter des Projektes heranzuziehen.

6 Summary

Dehorning of calves is a common procedure in cattle farming. The thesis at hand examines, how the chosen method of dehorning influences the heart rate variability (HRV) of calves, as indicator for their welfare and on the painfulness of the respective procedure. The study was conducted on 40 calves randomly assigned to one of four treatments: injection of 1,5 ml Isoeugenol or clove oil under each hornbud as an alternative method of dehorning, thermal dehorning using a hot iron (with sedation and local anesthesia) was examined as well as injection of 1,5 ml of physiological saline under each hornbud in a control group. Heart rate was recorded before and after the respective intervention on day 0, day 1, day 3 and day 7 for eight hours (days 0 and 1) and four hours (days 3 and 7) respectively via an electrode strap and sensor manufactured by Polar, data was prepared with Polar Precision Performance SW Software and HRV parameters subsequently calculated with the help of software Kubios. Due to technical failures in video and heart rate recording data of only 29 of the 40 participating animals was usable for HRV analysis. Due to several lacking data on day 0, finally only 22 animals could be used for statistical analysis. Data processing and evaluation was conducted by a person blinded for treatment. Evaluation was restricted to data obtained from periods with the animals at rest, defined by a lying calf, without disturbance or manipulation, and periods with less than five percent faults per minute in the heart rate curve. None of the analysed HRV-parameters (timerange, frequencyrange and non-linear parameters) nor the heart rate showed any differences between the four treatments. The hypothesis, that the highest HRV after the intervention would occur in the control group treated with physiological saline and the lowest HRV in the group dehorned with hot iron, with the other two groups in between, was not confirmed. The small sample size caused by interruptions in the videorecordings and disturbances in the heart rate recordings could be a reason for these results. Other factors such as age, gender, race or weight of the calves or different ambient temperatures may have further contributed to the problem, albeit being taken into consideration in the statistical analysis. In sum the analysis of heart rate and HRV gave no evidence for differences in the autonomic nervous systems reaction to the various procedures examined. For the assessment of the welfare of the calves further parameters of the project have to be taken into account.

7 Danksagung

Ich möchte mich bei jenen Personen bedanken, die mich im Laufe des Studiums aber vor allem während der Zeit, in der diese Diplomarbeit verfasst wurde, unterstützt haben.

Beginnen möchte ich bei meiner Betreuerin **Ao. Univ.-Prof. Dr. med. vet. Susanne Waiblinger**. Für die Begutachtung dieser Diplomarbeit, Betreuung, Hilfestellung, und konstruktive Kritik an dem Inhalt dieser Arbeit möchte ich mich bedanken. Bei **Herrn Prof. Andreas Futschik** möchte ich mich für die Hilfe bei der statistischen Analyse der Daten bedanken. Mark, vielen lieben Dank für die Hilfe bei der Interpretation der Daten, die lustigen Gespräche und die emotionale Unterstützung zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Ein besonderer und spezieller Dank gilt **ALLEN Kälbern**, die an dem Versuch teilgenommen haben. Ohne sie wäre diese Studie nicht möglich gewesen.

Ein herzliches Dankeschön gilt meinen Mitbewohnerinnen **Marianne** und **Lydia**, die mich immer unterstützt haben und sich Wochenlang mein Jammern anhören mussten.

Abschließend möchte ich mich bei meiner **Mama Michaela**, meinem **Stiefvater Thomas Blösel** und meinen **Großeltern Margarete & Peter Stöger** von Herzen bedanken. Ohne euch wären die letzten 7 Jahre nicht möglich gewesen. Ihr wart in jeder Lebenslage für mich da und habt mir den Rücken freigehalten. Danke für euren Rückhalt. Ich möchte mich für die emotionalen, finanziellen und gastronomische Hilfe der letzten 7 Jahre bedanken. Ich liebe euch über alles!

8 Abkürzungen

HF = high frequency

HRV = heart rate variability = Herzfrequenzvariabilität

HR = Herzfrequenz (heart rate)

LF = low frequency

LFG = Lehr- und Forschungsgut

LA = Lokalanästhetikum

NaCl = Natriumchlorid

RMSSD = root mean square of successive differences

RR-Intervall = Abstand zweier Herzschläge (R-Zacken im EKG)

SDNN = Standardabweichung aller RR-Intervalle

Tab = Tabelle

TSchG = Tierschutzgesetz

9 Literaturverzeichnis

- ADCOCK, S. J. & TUCKER, C. B. 2018. The effect of disbudding age on healing and pain sensitivity in dairy calves. *Journal of dairy science*, 101, 10361-10373.
- ANNUNZIO, G. 2017. Die HRV-Analyse als Präventionsinstrument gegen Stress der Mitarbeitenden im Unternehmen. Diplomarbeit Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften.
- APA-OTS. 2013. Österreich: Bald keine Rinder mit Hörnern mehr [Online]. Available: https://www.ots.at/presseaussendung/OTS_20130723_OTS0047/oesterreich-bald-keine-rinder-mit-hoernern-mehr [Accessed 20.11.2020 2020].
- BAARS, T. 2016. Hörner und Wärmeregulierung-Schlüsse aus Hornformen und Wärmebildern. *Lebendige Erde*, 3, 36-39.
- BAARS, T. 2019. Kuhhorn, Milchqualität und Wärmeregulierung-Die Analyse von Stoffwechselprodukten in der Milch klärt Zusammenhänge. *Lebendige Erde*, 38-42.
- BORELL, E., LANGBEIN, J., DESPRÉS, G., HANSEN, S., LETERRIER, C., MARCHANT-FORDE, J., MARCHANT-FORDE, R., MINERO, M., MOHR, E., PRUNIER, A., VALANCE, D. & VEISSIER, I. 2007. Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals — A review. *Physiology & Behavior*, 92, 293-316.
- BUER, H. & PALZER, A. 2016. Enthornung. In: BUER, H. & PALZER, A. (eds.) *NutztierSkills. 2., vollständig aktualisierte und erweiterte Auflage ed.: Schattauer GmbH. 134-138.*
- CARTUS, A. T. 2009. Identifizierung und Quantifizierung mikrosomaler Metaboliten von Eugenol, Isoeugenol, Methyleugenol und Methyloisoeugenol. Diplomarbeit Technische Universität Kaiserslautern.
- CHAIEB, K., HAJLAOUI, H., ZMANTAR, T., KAHLA-NAKBI, A. B., ROUABHIA, M., MAHDOUANI, K. & BAKHROUF, A. 2007. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (Syzigium aromaticum L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research*, 21, 501-506.
- DANIEL, P. M., DAWES, J. D. K., PRICHARD, M. M. L. & CLARK, W. E. L. G. 1953. Studies of the carotid rete and its associated arteries. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 237, 173-208.
- DEMETER. 2020. Richtlinien für die Zertifizierung »Demeter« und »Biodynamisch« [Online]. Demeter. Available: https://www.demeter.de/sites/default/files/richtlinien/richtlinien_gesamt.pdf#page=35 [Accessed 2020].
- DESPRÉS, G., VEISSIER, I. & BOISSY, A. 2002. Effect of autonomic blockers on heart period variability in calves: evaluation of the sympatho-vagal balance. *Physiological Research*, 51, 347-353.
- ENGELHARDT, W. 2015a. Die Stressantwort des Körpers. In: BREVES, G., DIENER, M., GÄBEL, G. & VON ENGELHARDT, W. (eds.) *Physiologie der Haustiere. 5., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Enke Verlag.*
- ENGELHARDT, W. 2015b. Glucocorticoide. In: BREVES, G., DIENER, M., GÄBEL, G. & VON ENGELHARDT, W. (eds.) *Physiologie der Haustiere. 5., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Enke Verlag.*
- FRAHM, S., DI GIMINIANI, P., STANITZNIG, A., SCHOISWOHL, J., KRAMETTER-FRÖTSCHER, R., WITTEK, T. & WAIBLINGER, S. 2020. Nociceptive Threshold of

- Calves and Goat Kids Undergoing Injection of Clove Oil or Isoeugenol for Disbudding. *Animals*, (Basel) 10, 1228.
- GAUDE, I. 2014. *Besaugen bei Kälbern der Rasse Deutsches Fleckvieh: Risikofaktoren und Bedeutung der individuellen Stressreaktion. Bibliothek der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Doktorarbeit.*
- GRØNDAHL-NIELSEN, C., SIMONSEN, H. B., LUND, J. D. & HESSELHOLT, M. 1999. Behavioural, endocrine and cardiac responses in young calves undergoing dehorning without and with use of sedation and analgesia. *The Veterinary Journal*, 158, 14-20.
- HAGEN, K., LANGBEIN, J., SCHMIED, C., LEXER, D. & WAIBLINGER, S. 2005. Heart rate variability in dairy cows—influences of breed and milking system. *Physiology & behavior*, 85, 195-204.
- HEMPSTEAD, M. N., WAAS, J. R., STEWART, M., CAVE, V. M., TURNER, A. R. & SUTHERLAND, M. A. 2018. The effectiveness of clove oil and two different cautery disbudding methods on preventing horn growth in dairy goat kids. *PLOS ONE*, 13, e0198229.
- HOFMANN, D. & MELZIG, M. F. 2014. Das persönliche Pflanzenporträt: Gewürznelken. *Zeitschrift für Ganzheitliche Tiermedizin*, 28, 92-95.
- HUBER, J., ARNHOLDT, T., MÖSTL, E., GELFERT, C.-C. & DRILLICH, M. 2013. Pain management with flunixin meglumine at dehorning of calves. *Journal of Dairy Science* 96: 132-140.
- JUFFINGER, A., SCHOISWOHL, J., STANITZNIG, A., KRAMETTER-FRÖTSCHER, R., WITTEK, T. & WAIBLINGER, S. 2021. Mechanical Nociceptive Threshold, Tissue Alterations and Horn Growth in Calves after Injection of Isoeugenol or Clove Oil under the Horn Bud. *Animals*, 11, 828.
- JUFFINGER, A., STANITZNIG, A., SCHOISWOHL, J., KRAMETTER-FRÖTSCHER, R., WITTEK, T. & WAIBLINGER, S. 2019. *Verhalten und Schmerzsensitivität von Kälbern nach Injektion von Nelkenöl und Isoeugenol unter die Hornknospe mit dem Ziel der Verhinderung des Hornwachstums. 187-197.-51. Internationale Tagung Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL).*
- KILLICH, M. 2018. Einfluss von Sympathikus und Parasympathikus auf die Herzfrequenz. In: KILLICH, M. (ed.) *Kleintierkardiologie*. 1. Auflage ed.: Georg Thieme Verlag.
- KLING-EVEILLARD, F., KNIERIM, U., IRRGANG, N., GOTTARDO, F., RICCI, R. & DOCKÈS, A. C. 2015. Attitudes of farmers towards cattle dehorning. *Livestock Science*, 179, 12-21.
- KREMER, H.-J. 2002. *Gesichtspunkte zum Rind in der Biologisch-Dynamischen Wirtschaftsweise und in der anthroposophischen Literatur*. Forschungsring für Biologisch-Dynamische Wirtschaftsweise eV.
- KUPCZYŃSKI, R., BUDNY, A., ŚPITALNIAK, K. & TRACZ, E. 2014. Dehorning of Calves – Methods of Pain and Stress Alleviation – A Review. *Annals of Animal Science*, 14, 231.
- MALIK, M. 1996. Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use: Task force of the European Society of Cardiology and the North American Society for Pacing and Electrophysiology. *Annals of Noninvasive Electrocardiology*, 1, 151-181.
- MENZLER, D. 2020. *Haben alle Rinder Hörner? [Online]. Available: <https://www.landwirtschaft.de/landwirtschaft-verstehen/haetten-sies-gewusst/tierhaltung/haben-alle-rinder-hoerner> [Accessed on 08 November 2020].*

- MOHR, E., LANGBEIN, J. & NÜRNBERG, G. 2002. Heart rate variability: a noninvasive approach to measure stress in calves and cows. *Physiology & Behavior*, 75, 251-259.
- MOLAEI, M. M., AZARI, O. & ESMAEILZADEH, S. 2014. Study of calves disbudding following injection of clove oil under horn bud. *Journal of Veterinary Research*, 69, 363-369.
- MOLAEI, M. M., MOSTAFAVI, A., KHEIRANDISH, R., AZARI, O. & SHADDEL, M. 2015. Study of disbudding goat kids following injection of clove oil essence in horn bud region. *Veterinary research forum : an international quarterly journal*, 6, 17-22.
- NICKLES, K. & STARZ, W. 2001. Laufstallhaltung behornter Milchkühe. Seminararbeit Lehr- und Forschungszentrum für Landwirtschaft (LFZ) Raumberg-Gumpenstein, Institut für Biologische Landwirtschaft und Biodiversität der Nutztiere, Abteilung für Biologische Grünland- und Viehwirtschaft.
- NÖBAUER, C. 2011. *Herzfrequenzvariabilität von Kälbern nach der Enthornung*. Diplomarbeit Veterinärmedizinische Universität Wien
- OLTMANN, M. 2019. *Untersuchungen zu Hochtemperaturreaktionen in Durchflussreaktoren für die Synthese ausgewählter Feinchemikalien und für die Validierung von Hypothesen unter präbiotischen Bedingungen*. Hannover: Institutionelles Repositorium der Leibniz Universität Hannover.
- RADÜNZ, M., DA TRINDADE, M. L. M., CAMARGO, T. M., RADÜNZ, A. L., BORGES, C. D., GANDRA, E. A. & HELBIG, E. 2019. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. *Food Chemistry*, 276, 180-186.
- ROSENBERGER, G. 1964. *Die Enthornungsmethoden für Rinder*, Hannover: Schaper. 1957, 1 Auflage.
- SALEH, Y., KIRCHNER, A., PAULI, E., HILZ, M. J., NEUNDÖRFER, B. & STEFAN, H. 2000. Temporallappenepilepsien Einfluss der Fokussseite auf die autonome Regulation der Herzfrequenz? *Der Nervenarzt*, 71, 477-480.
- SCHOISWOHL, J., STANITZNIG, A., WAIBLINGER, S., FRAHM, S., KRAMETTER-FROETSCHER, R. & WITTEK, T. 2020. Suppression of horn growth in cattle by clove oil and isoeugenol. *Journal of Veterinary Behavior*, 36, 1-3.
- SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K., BOOTH-MCLEAN, M., MCALLISTER, T. & MEARS, G. 2005. Physiological and behavioural changes in Holstein calves during and after dehorning or castration. *Canadian journal of animal science*, 85, 131-138.
- SPENGLER NEFF, A., HURNI, B., STREIFF, R., BIGLER, M., HAENI, R., IVE MEYER, S., KNÖSEL, M., LETSCH, A., LOEFFLER, T. & LUTKE SCHIPHOLT, H. 2015. *Die Bedeutung der Hörner für die Kuh, FiBL, Schweizlerland Verein für biologisch-dynamische Landwirtschaft, Demeter, Bioland Beratung GmbH und IBLA*.
- STAFFORD, K. J. & MELLOR, D. J. 2005. Dehorning and disbudding distress and its alleviation in calves. *Vet J*, 169, 337-49.
- STAFFORD, K. J. & MELLOR, D. J. 2011. Addressing the pain associated with disbudding and dehorning in cattle. *Applied Animal Behaviour Science*, 135, 226-231.
- STATISTIK-AUSTRIA. 2020. *Rinderbestand Österreich 2020* [Online]. https://www.statistik.at/web_de/statistiken/index.html; Statistik Austria. Available: https://www.statistik.at/web_de/statistiken/wirtschaft/land_und_forstwirtschaft/viehbestand_tierische_erzeugung/viehbestand/index.html [Accessed 2020].

- STEWART, M., STAFFORD, K. J., DOWLING, S. K., SCHAEFER, A. L. & WEBSTER, J. R. 2008. Eye temperature and heart rate variability of calves disbudded with or without local anaesthetic. *Physiol Behav*, 93, 789-97.
- STOCK, M. L., BALDRIDGE, S. L., GRIFFIN, D. & COETZEE, J. F. 2013. Bovine dehorning: Assessing pain and providing analgesic management. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 29, 103-133.
- SUTHERLAND, M. A., LARIVE, J., CAVE, V. & ZOBEL, G. 2018. Behavioural and physiological responses to clove oil injected under the horn bud of calves. *Applied Animal Behaviour Science*, 204, 29-36.
- VAN REENEN, C. G., O'CONNELL, N. E., VAN DER WERF, J. T. N., KORTE, S. M., HOPSTER, H., JONES, R. B. & BLOKHUIS, H. J. 2005. Responses of calves to acute stress: Individual consistency and relations between behavioral and physiological measures. *Physiology & Behavior*, 85, 557-570.
- VELISEK, J., SVOBODOVA, Z., PIACKOVA, V., GROCH, L. & NEPEJCHALOVA, L. 2005. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Vet Med*, 50, 269-275.
- WAIBLINGER, S., BINDER, R. & HAGEN, K. 2011. Enthornung oder Haltung horntragender Rinder und Ziegen aus veterinärmedizinischer, ethologischer, ethischer und tierschutzrechtlicher Sicht. *Internationale Fachtagung zu Fragen von Verhaltenskunde, Tierhaltung und Tierschutz, 5.- 7. Mai 2011*, München: Verlag der DVG Service GmbH, Gießen.
- WAIBLINGER, S., BINDER, R. & HAGEN, K. 2011. Enthornung oder Haltung horntragender Rinder und Ziegen aus veterinärmedizinischer, ethologischer, ethischer und tierschutzrechtlicher Sicht. Verlag der DVG Service GmbH.
- WEILER, M. 1987. *Zur Problematik der Enthornung bei Milchkühen. Diplomarbeit im Fach Tierproduktion, Universität des Landes Hessen Fachbereich Landwirtschaft.*
- WHITE, W. & IBSEN, H. L. 1936. Horn inheritance in Galloway-Holstein cattle crosses. *Journal of Genetics*, 32, 33.
- WINDIG, J. J., HOVING-BOLINK, R. A. & VEERKAMP, R. F. 2015. Breeding for polledness in Holstein cattle. *Livestock Science*, 179, 96-101.

Rechtsnormen:

Verordnung der Bundesministerin für Gesundheit und Frauen über die Mindestanforderungen für die Haltung von Pferden und Pferdeartigen, Schweinen, Rindern, Schafen, Ziegen, Schalenwild, Lamas, Kaninchen, Hausgeflügel, Straußen und Nutzfischen (1.Tierhaltungsverordnung). BGBl.II Nr. 485/2004, zuletzt geändert durch BGBl.II Nr.151/2017.

Tierschutzgesetz BGBl.I Nr. 74/1972 idF. BGBl.I Nr. 25/2006, zuletzt geändert durch BGBl.I Nr. 47/2018

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 -Time-domain Parameter	8
Tabelle 2 - Frequenzy-domain Parameter	8
Tabelle 3 - Nicht lineare HRV-Parameter	9
Tabelle 4 Inhaltsstoffe Gewürznelke	10
Tabelle 5 - Behandlungsgruppen	16
Tabelle 6 - Tagesablauf Tag 0 (Tag des Eingriffes)	17
Tabelle 7 - Tagesablauf Tag 1	17
Tabelle 8 - Tagesablauf Tag 3	17
Tabelle 9 - Tagesablauf Tag 7	18
Tabelle 10 - Ethogramm Direktbeobachtung.....	22
Tabelle 11 Verteilung von Geschlecht, Alter und Gewicht auf die schlussendlich in die statistische Analyse eingegangenen Tiere der verschiedenen Behandlungsgruppen	24
Tabelle 12 Ergebnisse der ANOVAs für die Differenzen der Parameter der HRV und HR zwischen Tag 1 und Tag 0 sowie zwischen Tag 7 und Tag 0 mit Behandlungsgruppe, Geschlecht, Alter an Tag 0 und Gewicht an Tag 7.....	27
Tabelle 13 Mittelwert \pm Standardabweichung der Parameter der HRV und der HR der in die statistische Analyse eingegangenen Tiere getrennt für die verschiedenen Behandlungsgruppen	29