

Aus dem Department für  
Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien  
(Departmentsprecher: Univ. Prof. Dr. Michael Hess)

Klinische Abteilung für Wiederkäuermedizin  
(Leiter: Univ. Prof. Dr. Thomas Wittek)

# Cortisolbestimmung zur Evaluierung der Stressantwort bei verschiedenen Enthornungstechniken bei Kälbern

Diplomarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades Magistra medicinae veterinariae  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

vorgelegt von

Christina Smetanig

Wien, im April 2020



- **BetreuerIn**  
Klinische Abteilung für Wiederkäuermedizin  
Dipl. ECBHM Univ.-Prof. Dr.med.vet. Thomas Wittek  
Mitbetreuende Assistentin  
Dr.med vet. Anna Stanitznig
- **BegutachterIn**  
Institut für Physiologie, Pathophysiologie und Biophysik  
Ao.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Rupert Palme

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung und Ziel der Arbeit</b> .....	1
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b> .....	2
2.1	Enthornung bei Rindern .....	2
2.1.1	Anatomische Grundlagen zum Hornwachstum.....	2
2.1.2	Genetisch hornlose Zucht.....	3
2.1.3	Gründe für die Enthornung bei Kälbern.....	3
2.1.4	Rechtliche Grundlagen und Zeitpunkt .....	4
2.1.5	Durchführung der Kälberenthornung.....	4
2.1.6	Methoden und Komplikationen.....	5
2.2	Nelkenöl.....	6
2.2.1	Allgemeines.....	6
2.2.2	Eugenol.....	6
2.2.2.1	Wirkung .....	7
2.2.2.2	Toxizität .....	8
2.3	Isoeugenol .....	8
2.3.1	Allgemein .....	8
2.3.2	Wirkung.....	9
2.3.3	Toxizität .....	9
2.3.4	Anwendungsgebiet von Eugenol und Isoeugenol .....	10
2.3.4.1	Einsatz in der Aquakultur .....	10
2.3.4.2	Untersuchungen bei Rindern .....	10
2.4	Cortisol.....	11
2.4.1	Allgemein .....	11
2.4.2	Cortisol als Stressmarker.....	11

2.4.3	Transport und Bindungsmechanismen .....	12
2.4.4	Funktion .....	12
2.4.5	Cortisolnachweis .....	12
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
3.1	Haltung der Versuchstiere .....	14
3.2	Versuchsgruppeneinteilung .....	14
3.3	Durchführung der Enthornung .....	14
3.3.1	Gruppe Nelkenöl .....	15
3.3.2	Gruppe Isoeugenol .....	15
3.3.3	Gruppe NaCl .....	15
3.3.4	Gruppe Brennstab .....	15
3.4	Gewinnung der Speichelproben .....	16
3.5	Bestimmung der Speichelcortisolkonzentration .....	16
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>17</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>19</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>23</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	<b>24</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>25</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>26</b>
<b>10</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>30</b>
<b>11</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>31</b>

# 1 Einleitung und Ziel der Arbeit

Die artgerechte Nutztierhaltung hat in unserer Gesellschaft einen immer höheren Stellenwert und stellt daher sowohl Landwirtschaft als auch Veterinärmedizin vor neue Herausforderungen. Dabei ist das Tierwohl und auch die Arbeitssicherheit der Landwirte im Fokus der Betrachtungen, wobei nach einer schonenden Methodik der Enthornung von Kälbern für die Zukunft gesucht wird.

Die thermische Enthornung bei Kälbern ist in Österreich gemäß gültiger Rechtslage bis zu einem Lebensalter von 6 Wochen erlaubt, wenn es durch einen Tierarzt oder sachkundige Person mittels Sedierung, Lokalanästhesie und postoperativ wirksamen Schmerzmittel durchgeführt wird (§ 6 Anlage 2 Ziff. 2.8 der 1. Tierhaltungsverordnung BGBl.II Nr.485/2004 idF. BGBl.II Nr. 151/2017).

Diese Methode wird derzeit in Europa bei Kälbern in den landwirtschaftlichen Betrieben angewandt. Nach Schätzungen werden mit diesem Managementsystem rund 81,5 % der Milchrinder, 35,8 % der Mastrinder und 62,5 % der Rinder in der Mutterkuhhaltung enthornt (Oliver 2009). Die neuen Haltungsformen mit der Möglichkeit der freien Bewegung der Tiere in Laufställen bedingen eine erhöhte Verletzungsgefahr, sowohl für Tiere selbst, als auch für den Menschen (Bellof und Granz 2019). Diese Arbeit befasst sich mit einer alternativen Methodik der Enthornung von Kälbern, mit der subcutanen Injektion von Nelkenöl (Eugenol) oder Isoeugenol in den Bereich der Hornknospe. Es soll der Vergleich der Cortisolausschüttung der Kälber nach verschiedenen Enthornungsmethoden dargestellt werden. Die in den Speichelproben gemessenen Cortisolwerte erlauben einen Vergleich der Stressantwort und somit eine Beschreibung der Auswirkung der einzelnen Enthornungsmethoden der Kälber. Die Ergebnisse der Diplomarbeit können somit als Grundlage für weitere wissenschaftliche Studien zur Validierung dieser Methodik der Enthornung von Rindern verwendet werden.

Die Anwendung der alternativen Methoden der Enthornung von Kälbern mit der subcutanen Injektion von Nelkenöl und Isoeugenol lässt eine geringere Stressbelastung, im Vergleich zu der gängigen thermischen Enthornung, erwarten.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Enthornung bei Rindern

#### 2.1.1 Anatomische Grundlagen zum Hornwachstum

Die Hörner der Wiederkäuer sind als Hautorgane anzusehen. An der Stelle der späteren Hornanlage erscheint zuerst eine Epidermisverdickung, die von Haaren, Talg- und Schweißdrüsen durchsetzt ist. Das entspricht der fetalen Horngrundlage (Salomon et al. 2015, Schnorr und Kressin 2011). Der knöcherne Hornfortsatz (*Processus cornualis*) entsteht als Wucherung des Stirnbeins (*Os frontale*). Seine Bildung wird durch die epidermale Hornanlage induziert (König und Liebich 2019).

Im sechsten Lebensmonat beginnt die Pneumatisation des Hornfortsatzes. Vom *Sinus frontalis* beginnt die Aushöhlung des *Processus cornualis* durch Einwachsen der Stirnhöhenschleimhaut (König und Liebich 2019). Dadurch besteht die Gefahr, dass bei Verletzungen nahe der Hornbasis, ab dem Alter von einem Jahr, auch die Stirnhöhle eröffnet werden kann. Das geschieht bei der Enthornung von Rindern, die ab diesem Alter enthornt werden (Salomon et al. 2015).

Das Längenwachstum beginnt an der Hornbasis und beträgt während der ersten beiden Lebensjahre zirka 10 cm pro Jahr und reduziert sich dann auf zirka 3 cm pro Jahr. Das Hornwachstum kann für die Altersbestimmung bei Kälbern und Kühen herangezogen werden (Baumgartner 2014, Salomon et al. 2015). Eine Besonderheit bei den Rindern ist, dass bei hoher Stoffwechselbelastung, zum Beispiel bei Trächtigkeit und Laktation, weniger Horn oder Horn von verminderter Qualität gebildet wird, somit werden Hornringe gebildet. Die Blutversorgung wird von den Endästen der *Arteria* und *Vena temporalis superficialis*, nämlich der *Arteriae* und *Venae cornuales* übernommen. Die beiden Gefäße weisen einen besonderen Gefäßverlauf auf, weshalb man auf die Schnittlinie bei einer Amputation des Horns achten muss. Die Schnittlinie muss dicht genug am Stirnbein proximal zum Eintritt der Gefäße in den Knochen erfolgen (König und Liebich 2019).

Das Horn wird über den *Ramus cornualis* des *Nervus zygomaticotemporalis* innerviert, der ein Ast des *Nervus trigeminus* ist. Das Lokalanästhetikum für die Enthornung wird kaudal der Mitte zwischen Hornbasis und Augenwinkel und ventral der *Linea temporalis* injiziert (König und Liebich 2019).

### **2.1.2 Genetisch hornlose Zucht**

Die genetische Hornlosigkeit ist ein länger verfolgtes Zuchtziel. Dabei handelt es sich um eine nicht invasive Option, um die gängige Praxis der Enthornung durch genetische Selektion zu ersetzen. Das Gen, das die Hornentwicklung unterdrückt, ist autosomal dominant. Der Genort für die Hornlosigkeit befindet sich auf dem Rinderchromosom 1 (Harlizius et al. 1997). Bei diesem Gen ist das hornlose Merkmal dominant und das Horn-Allel rezessiv.

Das bedeutet, dass Kälber, die mindestens ein hornloses Allel auf diesen Genort aufweisen, hornlos auf die Welt kommen (Pond 2012). Neuere Studien zeigen, dass die Hornausbildung nicht nur von einem Genort gesteuert werden, aber die genauen Gene, die dafür verantwortlich sind, konnten bisher noch nicht detektiert werden (Allais-Bonnet et al. 2013).

Genetisch hornlose Rinder können vereinzelt sogenannte Wackelhörner aufweisen. Es handelt sich dabei um Hornwucherungen oder hornähnliche Ausprägungen, die nicht fest mit dem Schädel verwachsen sind (Medugorac et al. 2013).

Bei manchen Fleischrinderrassen wie Aberdeen Angus, Galloway ist eine natürliche genetische Hornlosigkeit schon lange bekannt. In Mitteleuropa wird momentan vor allem an horntragenden Milchrassen, wie Holstein, Braunvieh und Fleckvieh eine weitere Ausbreitung der natürlichen Hornlosigkeit angestrebt (Sambraus 2011, Schafberg und Swalve 2015). Eine wichtige Rolle spielen die veränderte Grundhaltung der Landwirte gegenüber der genetisch hornlosen Zucht, um für mehr Tierwohl zu sorgen (Schafberg und Swalve 2015).

### **2.1.3 Gründe für die Enthornung bei Kälbern**

Das Enthornen ist ein routinemäßiges schmerzhaftes Verfahren um das landwirtschaftliche Management zu erleichtern (Waiblinger 2012). Aufgrund der Veränderung der Haltungsbedingungen von der Anbindehaltung zur Laufstallhaltung steigt das Verletzungsrisiko der Landwirte und der Tiere selbst.

Hornlosigkeit trägt zu mehr Arbeitssicherheit und Tiergesundheit bei, da Verletzungen durch Hornstöße vermieden werden können. Weitere Argumente, die für die Enthornung sprechen sind geringere Stallbaukosten (weniger Platz), weniger anspruchsvolles Herdenmanagement und bessere Transportmöglichkeiten der Tiere. Hornlosigkeit wirkt sich aber negativ auf das Wohlbefinden von Rindern aus. Die Hörner spielen im Sozialverhalten eine wichtige Rolle. Die Herdenstruktur wird durch die Rangordnung der Tiere stabilisiert. Dabei spielen die Größe der Hörner und das Alter der Tiere eine wichtige Rolle, aber auch die Funktion des Drohens kann nicht mehr von den Artgenossen erkannt werden und es kommt häufiger zu Auseinandersetzungen. Das Verletzungsrisiko von Landwirten und der Tiere selbst, kann durch den richtigen Umgang mit Tieren, durch eine gute Mensch-Tier-Beziehung und durch den geeigneten Stallbau gesenkt werden (Waiblinger 2012).

#### **2.1.4 Rechtliche Grundlagen und Zeitpunkt**

Die Enthornung bei Kälbern ist in Österreich bis zu einem Lebensalter von 6 Wochen erlaubt, wenn es durch einen Tierarzt oder durch eine sachkundige Person mittels Sedierung, Lokalanästhesie und postoperativ wirksamen Schmerzmittel durchgeführt wird (§6 Anlage 2 Ziff. 2.8 der 1. Tierhaltungsverordnung BGBl.II Nr.485/2004 idF. BGBl.II Nr. 151/2017).

#### **2.1.5 Durchführung der Kälberenthornung**

Die Kälber müssen für kurze Zeit von einer Hilfsperson gehalten und fixiert werden um ein Sedativum zu verabreichen. Häufig wird 0,3 bis 0,5 ml Xylazin intramuskulär injiziert. Die alleinige Gabe von Xylazin reicht nicht aus, um die Schmerzreaktion zu verhindern. Die Wirkungsdauer beträgt ca. 20 Minuten, somit kehrt die Schmerzempfindung noch in der Zeit des intensivsten Schmerzes zurück (Waiblinger 2012). Nach der Sedierung des Kalbs wird eine lokale Schmerzausschaltung mittels Leitungsanästhesie des *Ramus cornualis* des *Nervus zygomaticus* subcutan (s.c.) auf halber Strecke zwischen Hornbasis und temporalen Augenwinkel in Richtung Horngrund injiziert. Damit sich das Lokalanästhetikum besser verteilt, sollte die Einstichstelle kurz massiert werden (Dirksen et al. 2006). Durch diese Leitungsanästhesie werden wesentlich weniger belastungsanzeigende Verhaltensweisen sichtbar und es wird auch der Anstieg von Cortisol und der Herzfrequenz verringert. Häufig wird als lokale Schmerzausschaltung Procainhydrochlorid verwendet. Die Wirkung tritt ca. 10 Minuten nach der Verabreichung ein (Waiblinger 2012).

Zur postoperativen Schmerzbehandlung wird ein nichtsteroidales Antiphlogistika (NSAID) wie beispielsweise Carprofen oder Ketoprofen eingesetzt (Waiblinger 2012). Im Anschluss daran werden die Haare im Bereich der Hornknospe oder Hornansatzes mit einer Schermaschine geschoren (Dirksen et al. 2006).

### **2.1.6 Methoden und Komplikationen**

Es gibt verschiedene Enthornungsmethoden. Eine davon ist die thermische Enthornung mittels Thermokauter. Es gibt mehrere Arten von Thermokautern, die entweder mit Gas oder elektrisch erhitzt werden. Das Ende des Brennkopfes entspricht der Form und Größe der epithelialen Hornknospe. Dieses wird erhitzt und anschließend mit mäßigem Druck und leichter Längsachsendrehung ca. 10 Sekunden ein kreisförmiges Hautstück ausgebrannt, solange bis eine gelbbraune Oberfläche und seröse Flüssigkeit sichtbar wird. Bei der Verwendung von Thermokautern können Komplikationen auftreten. Wenn der Brennstab nicht ausreichend lange angesetzt wird, um die Hornknospe vollständig zu zerstören, kann es zu Krüppelhornbildung kommen. Wenn die entsprechende Stelle länger als ca. 10 Sekunden ausgebrannt wird, können zerebrale Komplikationen entstehen (Dirksen et al. 2006).

Eine weitere Methode ist das Verätzen der Hornknospe mittels Kaliumhydroxid- oder Natriumhydroxidhaltige Ätzmittel. Diese Methode ist laut österreichischem Tierschutzgesetz verboten (§ 7 (4) Tierschutzgesetz BGBl. I Nr. 118/2004 idF BGBl. I Nr. 61/2017). Durch das Verwenden von Ätzmittel können schwerwiegende Komplikationen auftreten. Es kann zu Stummelhörnern und Hirnhautentzündungen, Verätzungen im Kopfbereich, Panophthalmie, sowie zu einer Stomatitis führen (Dirksen et al. 2006).

Eine weitere Art ist die chirurgische Entfernung der Hornanlage. Dabei wird das Enthornungsgerät an der Hornknospe angelegt und anschließend wird die Haut und der Hornkegel bis zum Knochen durchtrennt. Der Nachteil daran ist, dass eine große Wunde entsteht (Dirksen et al. 2006).

Eine Injektion von Nelkenöl in die Hornknospe könnte eine weitere Möglichkeit für eine Enthornung sein. Bei einem Versuch bei fünf Tage alten Ziegenkitzen, konnte das Hornwachstum, nach Injektion von Nelkenöl in die Hornknospe gestoppt werden. Es kam zu

Kollagenauflösungen, einem Zerfall der Epidermis und Dermis der Hornknospe (Molaei et al. 2015). Nelkenöl, sowie dessen Derivat Ioeugenol, steht in Tabelle 1 der Rückstandshöchstmengenverordnung (EU) Nr. 37/2010 und ist somit für lebensmittelliefernde Tiere zugelassen.

## **2.2 Nelkenöl**

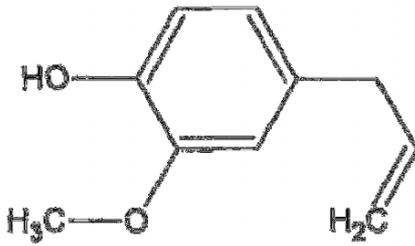
### **2.2.1 Allgemeines**

Nelkenöl ist ein Extrakt, das aus den Blütenknospen von einem Gewürznelkenbaum (*Syzygium aromaticum*, Familie der *Myrtaceae*) gewonnen wird. Dieser ist auch bekannt unter den Namen *Eugenia caryophyllata*, *Eugenia aromatic*, *Eugenia carophyllus* und ist ursprünglich auf den Molukken (indonesische Inselgruppe) beheimatet. Heute wird er in Tansania, Sansibar und Pemba, Malaysia, Indonesien, Sri Lanka, Madagaskar, Südindien, auf kleinen Inseln des indischen Ozeans sowie in den Tropen Amerikas kultiviert (Aqil et al. 2006, Lieberei und Reisdorff 2012). Die Blütenknospen werden zwei Mal im Jahr im geschlossenen Zustand geerntet, da sie zu diesem Zeitpunkt den höchsten Wirkstoffgehalt besitzen, und anschließend getrocknet (Lieberei und Reisdorff 2012).

Das ätherische Öl (Nelkenöl) der Knospen besteht aus 85 bis 90 % Eugenol, 15 % Eugenolacetat und bis zu 7 % aus  $\beta$ -Caryopyllen (Van Wyk et al. 2015). Das Nelkenöl besitzt viele bekannte medizinische Eigenschaften. Es hat eine antimikrobielle, antivirale, antiseptische und antimykotische Wirkung und wird häufig bei Zahn-, Kopf- und Gelenkschmerzen verwendet (Ross und Ross 2008). Des Weiteren wird es auch in der Kosmetik-, Seifen-, Parfum-, und Lebensmittelindustrie eingesetzt (Ross und Ross 2008).

### **2.2.2 Eugenol**

Eugenol ist der Hauptbestandteil des Nelkenöls und wird durch Destillation gewonnen. Es ist eine klare, farblose bis hellgelbe Flüssigkeit, die sehr vielfältig verwendet wird. Häufig wird Eugenol als Aromastoff in Lebensmitteln und pharmazeutischen Produkten, zahnärztlichen Zahnzementpräparaten, Parfümerie und als Insektenlockstoff eingesetzt (Yuwono et al. 2002).



**Abb. 1: Strukturformel von Eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol; Yuwono et al. 2002)**

### 2.2.2.1 Wirkung

Laut pharmakologischen Studien weist Eugenol antifungale, antibakterielle, insektizide, antiinflammatorische, antirheumatische, antioxidative sowie antikanzerogene Eigenschaften auf (Gülçin 2011). Eugenol besitzt eine antibakterielle Wirkung auf Gram-positive Bakterien (*Listeria monocytogenes*) und Gram-negative Bakterien (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*). Es wird häufig in der Lebensmittelindustrie verwendet, um lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüche von Menschen zu minimieren (Friedman et al. 2002). In mehreren Studien wurde auch eine antifungale Wirkung gegen mehrere verschiedenen Pilze nachgewiesen (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*; Daniel et al. 2009). Studien zeigen, dass Eugenol entzündungshemmende und antirheumatische Eigenschaften aufweist. Bei dem Versuch von Sharma et al. (1994) wurden bei männlichen Ratten 0,05 ml einer Suspension von toten *Mycobacterium tuberculosis* Bazillen in flüssigen Paraffin 5 mg/ml in das rechte Knie injiziert. Anschließend wurde 33 mg/kg Eugenol und Ingweröl für 26 Tage oral verabreicht. Dies führte zu einer starken Unterdrückung der Gelenksschwellungen (Sharma et al. 1994).

Es steigt das Interesse an natürlichen und sicheren Antioxidantien für Lebensmittel- und Pharmaanwendungen. Eugenol hat antioxidative Eigenschaften. Die antioxidative Aktivität basiert auf dem Prinzip der Verfügbarkeit von Elektronen, um freie Radikale zu neutralisieren. Es hängt mit der Anzahl und der Art des Hydroxylierungsmusters am aromatischen Ring zusammen. Je höher die Anzahl der Hydroxylgruppen im Phenolring desto stärker ist die Hemmung durch Oxidation. Eugenol besitzt einen aromatischen Ring (Gülçin 2011). Da Eugenol keine mutagene und krebserregenden Eigenschaften aufweist, wird es von der Lebensmittelindustrie als sicher angesehen (Gülçin 2011).

Die Verwendung von ätherischen Ölen stellt auch eine vielversprechende Alternative zur Bekämpfung von Insekten dar. In Brasilien wurde eine Studie mit Bohnenkäfer (*Acanthoscelides obtectus*) und Maiskäfer (*Sitophilus zeamais*) durchgeführt. Diese Käfer können einen erheblichen Schaden an den gelagerten Körnern verursachen (Jairoce et al. 2016).

In einer Studie wurden die antiproliferative Wirkung und die induzierte Apoptose von Tumorzellen durch Eugenol bewiesen. Es stellte sich heraus, dass Eugenol sich negativ auf Melanome, Hauttumore, Osteosarkome, Mastzelltumore, sowie auch auf Tumore des Magens auswirkt (Jaganathan und Supriyanto 2012).

### **2.2.2.2 Toxizität**

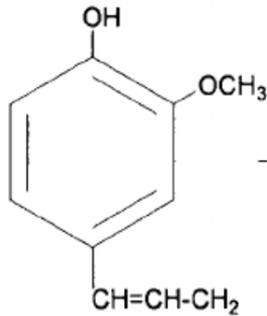
Die Studie wurde an Ratten und Mäusen durchgeführt. Das Ergebnis dieser Studie zeigt dass die Inzidenz der Lebertumore bei weiblichen Mäusen anstieg, bei den Ratten aber wurde keine Zunahme an der Inzidenz von Tumoren beobachtet. Weitere Studien zeigten, dass Eugenol bei hoher Konzentration bei Hunden und Katzen eine hepatotoxische Wirkung besitzt. Es gibt keine Berichte über die Karzinogenität von Eugenol beim Menschen (Yuwono et al. 2002).

## **2.3 Isoeugenol**

### **2.3.1 Allgemein**

Isoeugenol ist ein phenolischer Bestandteil der Gewürznelke und weist entzündungshemmende und antioxidative Wirkungen auf (Kaur und Sultana 2012). Es kommt natürlich in vielen Pflanzenderivaten (z.B. bei Nelken, Muskatnuss, Bohnenkraut) vor, aber es kann auch durch Isomerisierung chemisch hergestellt werden.

Es wird häufig in Parfums, Seifen, Cremes und Waschmittel verwendet, aber auch als Aromastoff in Backwaren, alkoholischen Getränken, sowie Kaugummis zugesetzt (National Toxicology Program 2010).



**Abb. 2: Strukturformel von Isoeugenol (2-methoxy-4-prop-1-enylphenol; Yuwono et al. 2002)**

### 2.3.2 Wirkung

Studien zeigen, dass Isoeugenol antiinflammatorische und antiarthritische Eigenschaften bei Ratten mit Arthritis aufweist. Bei den Tieren wurde mittels Injektionen eine Arthritis ausgelöst. Anschließend bekamen sie unterschiedliche Dosierungen von Isoeugenol oral verabreicht. Nach 3 Wochen wurden die Tiere untersucht und es stellte sich heraus, dass Ratten mit höheren Konzentrationen eine geringere Entzündungsreaktion und Gelenkschwellung aufweisen, als die Ratten die geringeren Dosen an Isoeugenol bekamen. Dieser Versuch veranschaulicht, dass die orale Gabe von Isoeugenol das Ausmaß einer Arthritis durch dessen entzündungshemmende Wirkung vermindern kann (Kaur und Sultana 2012).

Isoeugenol wird auch in der Fischenästhesie eingesetzt, da es eine sedierende Wirkung besitzt (FDA 2017, Ross und Ross 2008). In Neuseeland, Australien, Chile, Finnland und Färöer wird das wasserlösliche Anästhetikum AQUI-S legal verwendet. Dadurch wird der verursachte Stress bei den Fischen durch notwendiges Handling vermindert (Heard et al. 2014).

### 2.3.3 Toxizität

Es liegen keine Daten über die Toxizität von Isoeugenol bei Wiederkäuern vor. Dafür gibt es viele Studien bei Ratten und Schweinen. Isoeugenol besitzt eine akute Toxizität.

Es hat eine letale Dosis von 50 % (LD50) nach oraler Gabe von 1410 mg/kg Körpergewicht bei Schweinen. Bei Ratten liegt die letale Dosis bei 1560 mg/kg Körpergewicht (Jenner et al. 1964).

### **2.3.4 Anwendungsgebiet von Eugenol und Isoeugenol**

#### **2.3.4.1 Einsatz in der Aquakultur**

In der Aquakultur steigt das Interesse an der an der Nutzung von Nelkenöl. Dieses wird vermehrt als Anästhetikum eingesetzt, da es eine gute Alternative zu dem herkömmlich verwendeten Anästhetikum MS-222 ist. Es ist kostengünstiger, hat eine schnellere Einleitung und Erholungsphase nach der Anästhesie und ist weniger schädlich für den Menschen. Die Anästhetika werden eingesetzt um auf der einen Seite den Stress zu reduzieren., der z.B. durch Transport, chirurgische Eingriffe, Blutabnahmen, Markierungen, Messungen künstliche Besamung bei Fischen entsteht. Auf der anderen Seite wird auch der Umgang mit ihnen erleichtert ( Friedman et al. 2002, Ross und Ross 2008, Zaikov et al. 2008).

Nelkenöl wurde von der Food and Drug Administration der USA (FDA) als GRAS (generally regarded as safe) freigegeben. Das gilt aber nur für die Verwendung in der Zahnmedizin oder als Zusatzstoff bei Tierfutter, aber nicht bei der Verwendung als Fischbetäubungsmittel. Deshalb wurde ein neues Präparat entwickelt, das aus 50 % Isoeugenol besteht und dieses wurde in die INAD (Investigative New Animal Drug) aufgenommen. Somit darf es als Fischnarkotikum angewendet werde (FDA 2017, Ross und Ross 2008).

#### **2.3.4.2 Untersuchungen bei Rindern**

In Neuseeland wurde eine Studie durchgeführt, um die akute und längerfristige Schmerzantwort zwischen der Injektion von Nelkenöl und thermische Enthornung zu vergleichen. Dabei wurden 40 Kälber untersucht, die in vier Gruppen aufgeteilt wurde. Es gab eine Kontrollgruppe, eine Gruppe, die mit Lokalanästhesie und eine Gruppe, die ohne Lokalanästhesie enthornt wurden. Die Tiere in der vierten Gruppe bekamen eine Injektion von 0,5 ml Nelkenöl unter die Hornknospe injiziert. Die Nelkenölgruppe zeigte weniger Verhaltensveränderungen in Bezug auf den Schmerz in den ersten 2 und 24 h.

Im Gegenzug dazu zeigten die Tiere, die thermisch enthornt wurden vermehrtes Kopfschütteln und verminderte Bewegung und Spielverhalten. Zwei Tage nach der Behandlung gab es keinen Verhaltensunterschied zwischen den getesteten Methoden. Dies deutet darauf hin, dass die Nelkenölbehandlung während der ersten Nachbehandlungsphase nicht so schmerzhaft als die thermische Methode war (Sutherland et al. 2018).

## 2.4 Cortisol

### 2.4.1 Allgemein

Das Hypothalamus-Hypophysenvorderlappen-System besteht aus mehreren neuroendokrinen Achsen. Eine davon ist die Stressachse. Diese Achse besteht aus dem Hypothalamus, der Hypophyse und aus der Nebennierenrinde (Engelhardt 2015).

Cortisol (4-Pregnen-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-triol-3,20-dion) ist ein aus der Nebennierenrinde ausgeschüttetes Steroidhormon, welches aus der Vorstufe Cholesterin produziert wird. Es gehört zu der Gruppe der Glucocorticoide. Innerhalb des Biosynthesewegs des Cortisols, entstehen andere wichtige Steroidhormone wie Corticosteron, Progesteron, androgene Steroide und Aldosteron als Zwischen- oder Nebenprodukte (Engelhardt 2015).

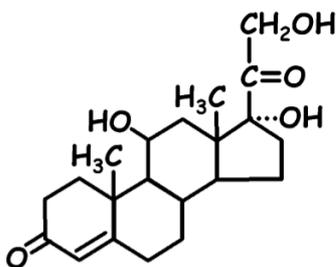


Abb. 3: Strukturformel von Cortisol (4-Pregnen-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-triol-3,20-dion; Palme et al. 2015)

### 2.4.2 Cortisol als Stressmarker

Die Ausschüttung des Cortisols aus der *Zona fasciculata* der Nebennierenrinde wird zuerst durch das Corticotropin-releasing Hormon (CRH) aus dem Hypothalamus und nachfolgend

über das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) aus der Adenohypophyse stimuliert. Dieser Vorgang wird über eine negative Rückkopplung reguliert (Gradl und Köhler 2017).

### **2.4.3 Transport und Bindungsmechanismen**

Cortisol wird von der Nebennierenrinde in die Blutbahn abgegeben und ein Teil wird von Albumin und anderen spezifischen Bindungsproteinen gebunden. Cortisol in gebundener Form ist unwirksam und nur der ungebundene Anteil ist biologisch wirksam. Ein weiterer wichtiger Punkt in Bezug auf die endokrinen Regulationsmechanismen ist, dass sich bei steigendem Stress die Bindungsproteine reduzieren, damit ein hoher Anteil an freiem Cortisol vorhanden ist. Jede Körperzelle besitzt Glucocorticoidrezeptoren, die die Transkription beeinflussen (Engelhardt 2015).

### **2.4.4 Funktion**

Cortisol weist mehrere wichtige Funktionen im Tierkörper auf. Einerseits spielen die Glucocorticoide im Bereich des Glukose- und Fettstoffwechsels eine Rolle, da sie die Gluconeogenese in der Leber fördern und die Lipolyse im Fettgewebe stimulieren. Andererseits beeinflussen sie auch das Immunsystem, Schmerzempfindung und die Futteraufnahme der Tiere (Engelhardt 2015).

### **2.4.5 Cortisolnachweis**

Es gibt mehrere Möglichkeiten um Cortisol zu bestimmen. Es kann in Blut, Speichel und Haar, bzw. seine Metaboliten in Kot und Urin, gemessen werden. Eine nicht invasive Cortisolbestimmung kann mittels Kotprobenuntersuchungen durchgeführt werden. Es wurden Studien bei Schafen, Schweinen, Pferde, Hasen und Hunde zu den unterschiedlichen Extraktionsmethoden durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse werden die Extraktion der Steroide mittels Suspensionen der Kotproben in einem hochprozentigen einfachen Alkohol (80 %-iges Methanol) empfohlen. Dadurch entstehen hohe Extraktionsausbeuten (Palme et al. 2013). Eine Messung in Kotproben hat den Vorteil, dass diese ohne zusätzlichen Stress einfach gesammelt werden können. Kotproben sind auch weniger von pulsatilen Schwankungen des Cortisols betroffen, da sie eine kumulative Sekretion der Hormonen widerspiegeln (Palme 2012). Die Lagerung der Kotproben stellt aber einen kritischen Punkt

dar. Die gesammelten Kotproben müssen innerhalb von 30 min bei einer Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden, damit die Metaboliten von bakteriellen Enzymen nicht geschädigt werden (Palme 2012).

Eine weitere Methode, um die Metaboliten des Cortisols zu bestimmen, ist die Sammlung von Harnproben. Diese Methode ist schwierig durchzuführen und hat den Nachteil, dass diese nur mittels Verweilkatheter durchführbar ist. Dadurch wird sie selten angewendet (Palme et al. 1999).

Eine weitere einfache und nicht invasive Methode ist die Bestimmung des Cortisols im Speichel. Die Konzentration des Cortisols im Speichel ist unabhängig von der Speichelflussrate, da die Corticosteroide durch Diffusion in den Speichel gelangen. Ein Vorteil dabei ist die einfache Entnahme der Speichelproben mittels Salivetten. Nachteilig ist jedoch die erforderliche kurze Fixierung der Tiere während der Probenentnahme, die an sich Stress auslöst. Anschließend wird der Cortisolgehalt durch Enzymimmunoassays bestimmt (Negrão et al. 2004).

Aufgrund von täglichem und akutem Stress schwankt der Cortisolspiegel. Cortisol, das über Körperflüssigkeiten gemessen wird, gibt daher keine verlässliche Auskunft über den Langzeit Cortisolspiegel. Die Analyse aus den Haaren ist eine relativ neue Methode, um den Cortisolgehalt zu bestimmen (Wester und van Rossum 2015). Die Haare werden abgeschnitten, gereinigt, getrocknet, zerkleinert und abgewogen. Anschließend werden die vorbereiteten Haare über Nacht in Methanol eingelegt, um das extrahierte Cortisol mittels Immunoassays zu bestimmen. Eine erhöhte Haarcortisolkonzentration beim Menschen ist mit Herz-Kreislaufkrankungen, Fettleibigkeit und Stoffwechselsyndrom verbunden (Wester und van Rossum 2015).

Die Bestimmung des Cortisols im Blut ist eine invasive Methode. Das Cortisol ist nur in ungebundener Form im Blut biologisch aktiv und wird mittels Enzymimmunoassays bestimmt. Weiters gibt es direkte Methoden zur Bestimmung des Cortisolwertes im Blut. Damit wird das Gesamtcortisol bestimmt. Die Konzentration der Bluthormone kann sich innerhalb von Minuten ändern, da die Sekretion pulsierend erfolgt. Darüber hinaus stellt der Stress während der Probenentnahme (Fixierung und Nadelstich) eine erhebliche Einschränkung dar (Palme et al. 2005).

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Haltung der Versuchstiere**

Vorliegende Studie wurde von der Ethik- und Tierschutzkommission der Veterinärmedizinischen Universität Wien und vom Bundesminister für Wissenschaft, Forschung und Wirtschaft gemäß Paragraphen (§) 26 ff. Tierversuchsgesetz 2012 genehmigt (GZ 68.205/0049-WF/V/3b/2016).

Der Versuch wurde im Frühjahr 2019 am Lehr- und Forschungsgut der Veterinärmedizinischen Universität Wien in Niederösterreich durchgeführt. Die untersuchten Kälber der Rasse Fleckvieh blieben nach der Geburt ca. 24 Stunden bei der Kuh und wurden dann für 2 Wochen in Einzelboxen, den sogenannten Iglus, untergebracht. Anschließend wurden sie in Gruppen von mehreren Kälbern in einem Offenstall eingestallt. Alle Tiere wurden vor dem Versuch klinisch untersucht und nur gesunde Tiere nahmen an dem Versuch teil.

### **3.2 Versuchsgruppeneinteilung**

Es wurden insgesamt 40 Kälber in vier Gruppen zu je zehn Tieren eingeteilt. Die vier Versuchsgruppen wurden entsprechend der Enthornungsmethode in Gruppe Nelkenöl, Isoeugenol, Natriumchlorid (NaCl) und Brennstab untergliedert. Die Zuteilung erfolgte über eine computergenerierte Liste (Zufallsgenerator) nach der Reihenfolge der Geburt der Kälber.

### **3.3 Durchführung der Enthornung**

Die Kälber wurden innerhalb des Eingriffes kurzzeitig von einer Hilfsperson fixiert, um anschließend, die zu verabreichende Substanz, subcutan unter die Hornknospe beider Seiten zu injizieren.

### 3.3.1 Gruppe Nelkenöl

Den Kälbern der Gruppe Nelkenöl wurden mittels Injekt<sup>®</sup> Solo 2 ml Spritze (B. Braun Austria GmbH, Österreich) eine s. k. Injektion von 1,5 ml Nelkenöl (Herba Chemosan Apotheker-AG, Österreich) unter die Hornknospe beider Seiten verabreicht. Dabei wurden die Kanüle (BOVIVET 16G x 1-1/2" 1,6 x 38 mm, Jørgen KRUISE A/S, Dänemark) verwendet.

### 3.3.2 Gruppe Isoeugenol

Den Kälbern der Gruppe Isoeugenol wurden mittels Injekt<sup>®</sup> Solo 2 ml Spritze (B. Braun Austria GmbH, Österreich) eine s. k. Injektion von 1,5 ml Isoeugenol (Merck KGaA, Deutschland) unter die Hornknospe beider Seiten verabreicht. Dabei wurden die Kanüle (BOVIVET 16G x 1-1/2" 1,6 x 38 mm, Jørgen KRUISE A/S, Dänemark) verwendet.

### 3.3.3 Gruppe NaCl

Den Kälbern der Gruppe NaCl wurden mittels Injekt<sup>®</sup> Solo 2 ml Spritze (B. Braun Austria GmbH, Österreich) eine s. k. Injektion von 1,5 ml 0,9%igen NaCl-Lösung (Kochsalz "Braun" 0,9 % - Infusionslösung, B. Braun Austria GmbH, Österreich) unter die Hornknospe beider Seiten verabreicht. Dabei wurden die Kanüle (BOVIVET 16G x 1-1/2" 1,6 x 38 mm, Jørgen KRUISE A/S, Dänemark) verwendet.

### 3.3.4 Gruppe Brennstab

Die Tiere der Gruppe Brennstab bekamen zuerst eine Injektionsnarkose mit 0,1 mg/kg Xylazin (Sedaxylan 20 mg/ml, Dechra Veterinary Products GmbH, Österreich) intramuskulär appliziert und erhielten anschließend eine lokale Anästhesie im Bereich des *Ramus cornualis* des *Nervus zygomaticus*. Als lokales Anästhetikum wurde pro Seite 8 ml Procainhydrochlorid (Procamidol 20 mg/ml, Richter Pharma AG, Österreich) verwendet. Die Kälber wurden mit einem Enthornungsgerät (Akku-Enthorner Buddex; Albert Kerbl GmbH, Deutschland) thermisch enthornt und im Anschluss daran wurde die verödete Stelle lokal mit einem Blauspray (Cyclo Spray®, Dechra Veterinary Products GmbH, Österreich) eingesprüht.

### **3.4 Gewinnung der Speichelproben**

Die Probennahme erfolgte zu drei verschiedenen Zeitpunkten. Die erste Entnahme erfolgte direkt im Anschluss des ersten Eingriffes und dann 15 und 60 Minuten danach. Für alle drei Zeitpunkte, wurde dieselbe Technik zur Speichelgewinnung angewendet.

Zur Gewinnung der Speichelproben wurde eine an einer Kocher Klemme arretierte Salivette (Salivette<sup>®</sup> Cortisol, Sarstedt AG und Co. KG, Deutschland) verwendet. Diese wurde in die Backentasche der Tiere eingeführt und verweilte solange darin, bis sich makroskopisch genügend Speichel aufgesogen hatte. Diese Speichelproben wurden in den vorgesehenen Doppelzylinder der Salivette<sup>®</sup> Cortisol (Firma Sarstedt AG und Co. KG, Deutschland) verpackt und daraufhin bei minus 80°C bis zu der Speichelcortisol-Messung tiefgefroren und aufbewahrt.

### **3.5 Bestimmung der Speichelcortisolkonzentration**

Die Cortisol Konzentration des gewonnenen Speichels, wurde an der Abteilung für Physiologie, Pathophysiologie und Experimentelle Endokrinologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien bestimmt. Die tiefgefrorenen Speichelproben in den Doppelzylindern wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und danach bei einer Zentrifugalbeschleunigung von 2500 g für 10 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurden 50 µl von jeder zentrifugierten Probe in eine Biorad-Tube umgefüllt und 450 µl eines Enzymimmunoassay-Puffer dazugegeben. Dadurch wurde der Speichel 1:10 verdünnt. Daraufhin wurde die Cortisolkonzentration der 120 Proben mittels Cortisol Enzymimmunoassays bestimmt (Palme und Möstl 1997). Die Ergebnisse der Speichelcortisolkonzentration wurden auf dem Institut der Bioinformatik und Biostatistik der Veterinärmedizinischen Universität Wien analysiert und ausgewertet.

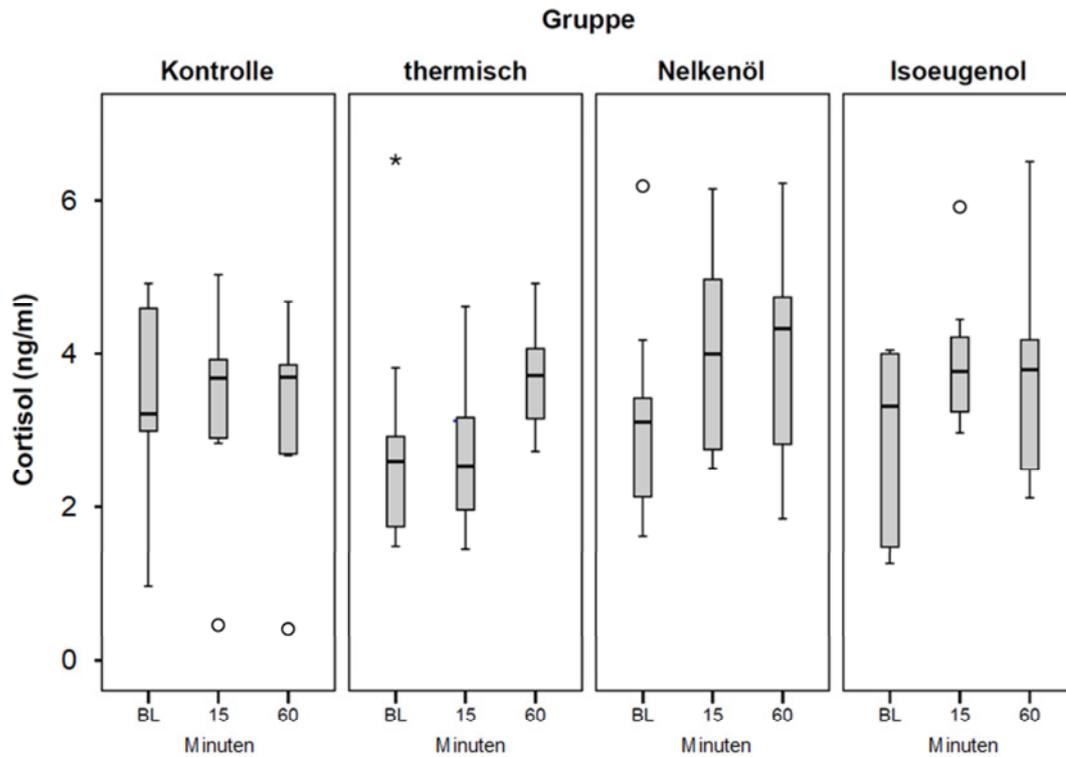
## 4 Ergebnisse

Die detaillierten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden in der Tabelle 1 dargestellt (siehe Anhang) und stellen die Cortisolkonzentration von Speichel von Kälbern in Nanogramm pro Milliliter (ng/ml), entsprechend der gewählten Testreihen, dar. Dabei wurden bei den Untersuchungen die Messzeitpunkte „vorher“, „15 min nach dem Eingriff“ und „60 min nach dem Eingriff“ der vier Gruppen festgelegt und die Cortisolwerte der Tiere bestimmt. Bei der Gruppe NaCl war eine Probe (Tier Nummer 35, nach 60 min) nicht auswertbar. Die statistische Auswertung und Evaluierung der Stressantwort auf die unterschiedlichen Behandlungsmethoden werden im Folgenden beschrieben.

Die Medianwerte und das 1./3. Quartil der Cortisolwerte wurden bestimmt und werden in der Abbildung 4 als Boxplot dargestellt. Die Kontrollgruppe wurde mit NaCl behandelt und wurde für die folgenden Vergleiche als Bezugsgröße herangezogen. Nach 15 Minuten war der Mittelwert des Cortisols bei der Gruppe NaCl und Gruppe Brennstab annähernd gleich hoch. Der Anstieg der absoluten Werte der Gruppe Nelkenöl und Gruppe Isoeugenol war signifikant erhöht, wobei der Anstieg bei der Gruppe Isoeugenol deutlich höher ausfiel. Der Mittelwert nach 60 Minuten zeigte bei den Gruppen Brennstab, Nelkenöl und Isoeugenol den annähernd gleich hohen Konzentrationslevel. Der höchste Cortisolwert wurde nach 60 Minuten bei der Gruppe Nelkenöl festgestellt und der geringste bei der Kontrollgruppe. Die Gruppen Brennstab und Isoeugenol zeigten dabei annähernd gleiche Werte in der Maximal-Cortisolausschüttung.

Das Boxplot Diagramm zeigt Median,  $\pm 25\%$ , 10-90% Intervall der Werte und Ausreißer der Gruppen. Die Ausreißer in der Gruppe Nelkenöl zum Zeitpunkt „vor dem Eingriff“ lagen bei einer Cortisolkonzentration von 6,2 ng/ml. Weitere Ausreiser zeigten sich beim Isoeugenol mit einem Cortisolwert von 5,9 ng/ml nach 15 Minuten und bei der Gruppe Brennstab bei der Baseline bei 6,5 ng/ml.

Das Boxplot Diagramm (Abbildung 4) zeigt die Ergebnisse in übersichtlicher grafischer Form.



**Abb. 4:** Boxplot Darstellung der Cortisolwerte der vier verschiedenen Enthornungsgruppen zu den bestimmten Messzeitpunkten (BL =Basislevel)

## 5 Diskussion

Die thermische Enthornung ist ein schmerzhaftes Verfahren, das zu schmerzinduzierten Stress führt (Stafford und Mellor 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde der Cortisolgehalt im Speichel bei 40 Kälbern bestimmt, um anschließend die Werte, zu gewissen Zeitpunkten, mit verschiedenen Enthornungsmethoden zu vergleichen. Das Ziel war es herauszufinden, ob die klassische Enthornung zu einer ähnlichen Cortisolausschüttung führt, wie eine durch subcutane Injektion von Nelkenöl und Isoeugenol.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen.

Alle untersuchten Enthornungsmethoden zeigten einen Anstieg der Cortisolwerte. Besonders stressresistente Tiere mit niedrigem Ausgangswert vor der Behandlung hatten über die Versuchsdauer einen nahezu konstanten Cortisolspiegel. Generell waren die Auswirkungen und die Cortisolwerte der Versuchstiere bei den gewählten Untersuchungsmethoden sehr inhomogen. Eine signifikante Ergebnisinterpretation ist aus den Datenerhebungen schwer möglich.

Die subcutane Injektion von Nelkenöl und Isoeugenol im Vergleich zur sachgemäß durchgeführten thermischen Enthornung, stellte keine signifikant niedrigere Stressbelastung dar.

Im Folgenden wird auf eine Vergleichsstudie eingegangen, bei der 40 männlichen Ziegenkitzen der Rasse Saanenziege, nach den gleichen Methoden wie in der vorliegenden Diplomarbeit untersucht wurden (Sigmund 2019). Dabei wurden die gleichen vier Enthornungsmethoden nämlich Nelkenöl, Isoeugenol, Brennstab und als Kontrolle NaCl verwendet. Die Ziegenkitze wurden in vier Gruppen zu zehn Tieren eingeteilt. Diese bekamen eine von den drei flüssigen Suspensionen jeweils 0,2 ml subcutan unter die beiden Hornknospen injiziert und die thermische Enthornung wurde nach einer Injektionsnarkose durchgeführt. Anschließend wurde eine Speichelprobe zu den Zeitpunkten: „direkt nach dem Eingriff“, 10 und 60 Minuten nach dem Eingriff mit einer Salivette aus der Maulhöhle entnommen. Die gesammelten Speichelproben wurden am selben Institut mittels desselben Cortisol EIAs bestimmt (Sigmund 2019).

Die Ergebnisse der Diplomarbeit von M. Sigmund 2019 werden mit der vorliegenden Arbeit verglichen und interpretiert. Bei beiden Diplomarbeiten wurden die gleichen Untersuchungsmethoden verwendet und daher ist der Vergleich in der weiteren Diskussion zulässig. Die Vergleichsstudie unterscheidet sich in den Messzeitpunkten, gemäß der Versuchsvorgabe und die unterschiedliche Dosierung der verwendeten Suspensionen. Die Ergebnisdarstellung erfolgte als Boxplot. In der vergleichenden Diplomarbeit wurde die Cortisolausschüttung aller Gruppen auf die Signifikanz überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass außer der Gruppe Isoeugenol, keiner der drei weiteren Gruppen statistisch signifikant höhere Stresshormonwerte bei den Messzeitpunkten gezeigt hat. Bei der Isoeugenol-Gruppe gab es signifikant höhere Werte zu den Zeitpunkten „vor dem Eingriff“ und nach 10 Minuten nach der Behandlung. Bei dem Gruppenvergleich war bei der Gruppe NaCl und Isoeugenol ein signifikanter Unterschied feststellbar. Im Gegensatz dazu, gab es bei den Kälbern bei zwei Gruppen einen signifikanten Unterschied. Der Unterschied war bei der Gruppe thermisch nach 60 Minuten und bei der Gruppe Nelkenöl nach 15 Minuten nachweisbar (Sigmund 2019).

Eine weitere aktuelle Studie in Neuseeland zu diesem Thema zeigt, dass Nelkenöl im Gegensatz zu thermischen Enthornung zu weniger Schmerz und Verhaltensveränderungen führt. Dabei wurden die akuten und längerfristigen Schmerzantworten zwischen der Injektion von Nelkenöl und thermische Enthornung verglichen. Dabei wurden 40 Kälber in vier verschiedene Gruppen eingeteilt. Es gab eine Kontrollgruppe, eine Gruppe, die mit Lokalanästhesie und eine Gruppe, die ohne Lokalanästhesie enthornt wurden. Die vierte Gruppe bekam eine Injektion von 0,5 ml Nelkenöl unter die Hornknospe injiziert. In der ersten 2 bis 24 Stunden zeigte die Nelkenölgruppe in Bezug auf Schmerz weniger Verhaltensveränderungen als die Vergleichsgruppen. Die Tiere, die thermisch enthornt wurden zeigten vermehrtes Kopfschütteln und verminderte Bewegung und Spielverhalten jedoch nach zwei Tagen gab es keine Verhaltensunterschiede zwischen den getesteten Methoden. Dies deutet darauf hin, dass die Nelkenölbehandlung während der ersten Nachbehandlungsphase nicht so schmerzhaft war. Die thermische Methode zeigte zwei Tagen nach der Behandlung keine Verhaltensunterschiede auf (Sutherland et al. 2018).

Natürlich spielen auch individuelle Unterschiede eine wichtige Rolle. Bei Wiederkäuern gibt es noch keine wissenschaftlichen Arbeiten bezüglich der Unterschiede von Alter und Geschlecht der Tiere. Eine Studie mit Pferden verglich Basis cortisolspiegel im Speichel bei

unterschiedlichem Alter, Geschlecht und Aufstallung. Laut dieser Arbeit gab es keinen signifikanten Unterschied (Aurich et al. 2015).

Eine weitere Studie beschreibt die Auswirkungen von lokaler Anästhesie und nicht steroidale Antiphlogistika in Bezug auf die Cortisolausschüttung von thermisch enthornten Kälbern. Dabei wurden insgesamt 100 Kälber untersucht, die jeweils in zehn Gruppen eingeteilt wurden. Nur sechs von diesen zehn Gruppen wurden enthornt. Die Cortisolkonzentration wurde vor und nach der Enthornung gemessen. Die Cortisolkonzentration der Tiere, die eine lokale Anästhesie und ein nicht steroidales Antiphlogistikum bekommen haben, wiesen eine ähnliche Plasmakonzentration auf, wie die Kontrolltiere, die nicht enthornt wurden. Somit sollen immer beide kombiniert angewendet werden (McMeeken et al. 1998).

Die angenommene Hypothese der vorliegenden Arbeit besagt, dass die Anwendung der alternativen Methoden der Enthornung von Kälbern mit der subcutanen Injektion von Nelkenöl und Isoeugenol eine geringere Stressbelastung, im Vergleich zur gängigen thermischen Enthornung, erwarten lässt. Die dokumentierten Ergebnisse führen zum Schluss, dass diese Hypothese nicht bestätigt werden kann. In der Arbeit ergaben sich in Bezug auf die untersuchte Cortisolausschüttung keine signifikanten Vorteile der subcutanen Injektion von Nelkenöl und Isoeugenol im Vergleich zur sachgemäße durchgeführten thermischen Enthornung.

Die Ergebnisse der Vergleichsstudie bei der Ziege (Sigmund 2019) zeigten annähernd gleiche Tendenzen hinsichtlich der Cortisolausschüttung bei annähernd gleichen Versuchsbedingungen und bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

Eine weitere vergleichende Studie aus Neuseeland zeigt jedoch für die Nelkenölgruppe in den ersten 2 bis 24 Stunden in Bezug auf Schmerz weniger Verhaltensveränderungen als die Vergleichsgruppen (Sutherland et al. 2018).

Dies deutet darauf hin, dass die Nelkenölbehandlung während der Nachbehandlungsphase nicht so schmerzhaft war, als die thermische Methode (Sutherland et al. 2018). Diese Studieninhalte korrelieren jedoch nicht mit den dokumentierten Ergebnissen der vorliegenden Evaluierung.

Ein wesentlicher Faktor in der Beurteilung der Ergebnisse ist unter anderem die Sedierung bei der thermischen Enthornung. Der Gruppe Brennstab wurde ein Sedativum (Xylazin; intramuskulär), eine lokale Anästhesie und postoperativ ein nichtsteroidales Antiphlogistikum verabreicht. Durch die angewendeten Medikamente ist ein Vergleich der Cortisolausschüttung mit den anderen Gruppen nur schwer möglich. Die Sedierung und lokale Anästhesie bedingte die niedrigen Cortisolwerte in den ersten 15 Minuten und erklärte den Anstieg, nach dem Nachlassen der Wirkung der Medikamente nach 60 Minuten.

Ein weiterer kritischer Aspekt ist der gewählte Untersuchungszeitraum. Der Cortisolgehalt wurde dabei in einem relativ kurzen Untersuchungszeitraum, nämlich in einem Zeitintervall unmittelbar vor der Behandlung, nach 15 Minuten und nach 60 Minuten, gemessen. Die kurzen Untersuchungsintervalle lassen keine signifikanten Unterschiede in den Behandlungsmethoden erkennen und ist daher bei künftigen Studien eine Ausweitung auf eine Nachbehandlungsphase über mehrere Tage anzustreben.

Die Anzahl der untersuchten 40 Tiere stellt einen guten Untersuchungsrahmen dar. Auf die individuellen Unterschiede (Geschlecht, Alter) der Kälber und deren Stressresistenz wird an dieser Stelle hingewiesen.

Die statistischen Auswertungen, Analysen und der Vergleich der Behandlungsmethoden der Arbeit zeigen die Unterschiede der Cortisolbelastung auf. Die inhomogenen Ergebnisse lassen jedoch keine Handlungsempfehlungen für die Wahl alternativer Enthornungsmethoden bei Kälbern zu.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Diplomarbeit wurde die Cortisolkonzentration im Speichel von Kälbern zur Evaluierung der Stressantwort bei unterschiedlichen Enthornungsmethoden untersucht. Dabei wurden zur Enthornung Nelkenöl, Isoeugenol, ein Brennstab und als Kontrolle NaCl bei je 10 Kälbern angewendet. Für die Untersuchung wurde den Versuchstieren die drei Suspensionen subcutan unter die Hornknospen injiziert und die thermische Enthornung mittels Buddex nach vorausgegangener Sedierung durchgeführt. Speichelproben wurden vor dem Eingriff, 15 und 60 Minuten nach dem Eingriff mittels Salivetten gesammelt. Die Cortisolkonzentration wurde mittels Enzymimmunoassays gemessen.

Bei allen untersuchten Enthornungsmethoden kam es zu einem Anstieg der Cortisolwerte. Bei der Gruppe Nelkenöl stieg der Cortisolgehalt nach 15 min beim größten Teil der untersuchten Tiere relativ stark an und baute sich nach 60 min tendenziell wieder ab. Besonders stressresistente Tiere mit niedrigem Ausgangswert vor der Behandlung zeigten über die Versuchsdauer einen nahezu konstanten Cortisolspiegel. Generell sind die festgestellten Stresswerte bei den Versuchstieren sehr inhomogen. Bei der Gruppe Isoeugenol sind im Cortisolvergleich annähernd gleiche Tendenzen wie bei der Gruppe Nelkenöl feststellbar gewesen. Die thermische Methode (Buddex) wurde mittels der damit verbundenen Sedierung von Kälbern durchgeführt. Die Anfangswerte der Versuchstiere lagen im Bereich der Vergleichsgruppen. Nach 15 min zeigten dabei die Mehrzahl der Versuchstiere nur mäßige Anstiege bzw. leicht abfallende Cortisolwerte. Diese stiegen nach 60 min jedoch annähernd auf die Werte der Vergleichsgruppen. Dieser Verlauf war auf die Sedierung zurückzuführen. Die Absolutwerte der Stressbelastung nach 60 min befand sich im Streubereich der restlichen Gruppen.

Die Hypothese der Arbeit konnte aufgrund der dokumentierten Ergebnisse nicht bestätigt werden. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die subcutane Injektion von Nelkenöl und Isoeugenol im Vergleich zur sachgemäß durchgeführten thermischen Enthornung, keine signifikant niedrigere Stressbelastung zeigte.

## 7 Summary

In the present diploma thesis, salivary cortisol was measured to evaluate different disbudding methods in calves. For dehorning clove oil, isoeugenol, an electro cauter and NaCl as a control method were used in ten calves each. For the study, the three suspensions were injected subcutaneously under the horn buds and the thermal disbudding was carried out by an electro cauter after previous sedation. Saliva samples were taken before the procedure, 15 minutes and 60 minutes after the procedure using salivettes. Cortisol was measured by enzyme immunoassays.

All investigated dehorning methods showed an increase in cortisol levels. In the clove oil group, the cortisol content increased relatively strongly in the majority of the animals after 15 minutes and tended to decrease again after 60 minutes. Animals with a low baseline before treatment showed almost constant cortisol level over the duration of the experiment. In general, results were very inhomogeneous, hindering a clear interpretation. In the isoeugenol group, cortisol levels showed the same tendency as in the clove oil group. The thermal method (Buddex) was performed with an associated sedation of calves. Baseline cortisol values were in the range of the control group.

The majority of the test animals showed only moderate increases or slightly decreasing cortisol levels after 15 minutes, probably due to sedation. After 60 minutes, the absolute cortisol levels were within the range of the other groups.

The hypothesis of the study couldn't be confirmed. In summary, the subcutaneous injection of the clove oil and isoeugenol did not result in significantly lower stress levels compared to properly performed thermal dehorning.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

ACTH =	Adenocorticotropes Hormon
CRH =	Corticotropin-releasing Hormon
EIA =	Enzymimmunoassay
LD50 =	mittlere letale Dosis
NSAID =	nichtsteroidales Antiphlogistikum

## 9 Literaturverzeichnis

Aqil F, Owais M, Ahmad I. 2006. Modern phytomedicine. Turning medical plants into drugs. Weinheim: Wiley-VCH, 404.

Aurich J, Wulf M, Ille N, Erber R, Lewinski M von, Palme R, Aurich C. 2015. Effects of season, age, sex, and housing on salivary cortisol concentrations in horses. *Domestic Animal Endocrinology*, 52: 11–16. DOI 10.1016/j.domaniend.2015.01.003.

Baumgartner W. Hrsg. 2014. *Klinische Propädeutik der Haus- und Heimtiere*. Achte., überarb. Aufl. Stuttgart: Enke, 525.

Bellof G, Granz S. 2019. *Tierproduktion. Nutztiere züchten, halten und ernähren*. Fünfzehnte., überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 639.

Daniel AN, Sartoretto SM, Schmidt G, Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado CA, Cuman RKN. 2009. Anti-inflammatory and antinociceptive activities A of eugenol essential oil in experimental animal models. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19 (1b): 212–217. DOI 10.1590/S0102-695X2009000200006.

Dirksen G, Gründer HD, Stöber M, Hrsg. 2006. *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. Fünfte. Aufl., unveränd. Nachdr. der Vierte. Aufl. Stuttgart: Parey, 1376.

Engelhardt W. 2015. *Physiologie der Haustiere*. Vierte., aktualisierte Aufl. Stuttgart: Enke, 712.

FDA U.S Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center of Veterinary Medicine. 2017. *Guidance for Industry. Concerns Related to the use of Clove Oil as an Anesthetic for Fish*.

Friedman M, Henika P, Mandrell R. 2002. Bactericidal Activities of Plant Essential Oils and Some of Their Isolated Constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*: 1545–1560.

Gradl D, Köhler A. 2017. *Prüfungen erfolgreich bestehen im Fach Tierphysiologie*. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer; UTB, 176.

Gülçin İ. 2011. Antioxidant activity of eugenol: a structure-activity relationship study. *Journal of Medicinal Food*, 14 (9): 975–985. DOI 10.1089/jmf.2010.0197.

Harlizius B, Tammen I, Eichler K, Eggen A, Hetzel DJS. 1997. New markers on bovine Chromosome 1 are closely linked to the polled gene in Simmental and Pinzgauer cattle. *Mammalian Genome*, 8 (4): 255–257. DOI 10.1007/s003359900404.

Heard DJ, West GD, Caulkett N, Hrsg. 2014. *Zoo animal and wildlife immobilization and anesthesia*. Second edition. Ames, Iowa: Wiley Blackwell, 968.

Jaganathan SK, Supriyanto E. 2012. Antiproliferative and molecular mechanism of eugenol-induced apoptosis in cancer cells. *Molecules*, 17 (6): 6290–6304. DOI 10.3390/molecules17066290.

- Jairoce CF, Teixeira CM, Nunes CFP, Nunes AM, Pereira CMP, Garcia FRM. 2016. Insecticide activity of clove essential oil on bean weevil and maize weevil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 20 (1): 72–77. DOI 10.1590/1807-1929/agriambi.v20n1p72-77.
- Jenner PM, Hagan EC, Taylor JM, Cook EL, Fitzhugh OG. 1964. Food flavourings and compounds of related structure I. Acute oral toxicity. *Food and Cosmetics Toxicology*, 2: 327–343. DOI 10.1016/S0015-6264(64)80192-9.
- Kaur G, Sultana S. 2012. Evaluation of antiarthritic activity of isoeugenol in adjuvant induced arthritis in murine model. *Food and Chemical Toxicology*, 50 (8): 2689–2695. DOI 10.1016/j.fct.2012.05.016.
- König HE, Liebich H-G, Hrsg. 2019. *Anatomie der Haustiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*. Siebte., aktualisierte und erweiterte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 853.
- Lieberei R, Reisdorff C. 2012. *Nutzpflanzen*. 118 Tabellen. Achte., überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme, 478.
- McMeeken CM, Stafford KJ, Mellor DJ, Bruce RA, Ward RN, Gregory NG. 1998. Effects of regional analgesia and/or a non-steroidal antiinflammatory analgesic on the acute cortisol response to dehorning in calves. *Veterinary Science* 1998; Vol: 64; Pp:147-150.
- Medugorac I, Allais-Bonnet A, Grohs C, Krebs S, Djari A, Graf A, Fritz S, Seichter D, Baur A, Russ I, Bouet S, Rothammer S, Wahlberg P, Esquerré D, Hoze C, Boussaha M, Weiss B, Thépot D, Fouilloux M-N, Rossignol M-N, van Marle-Köster E, Hreiðarsdóttir GE, Barbey S, Dozias D, Cobo E, Reversé P, Catros O, Marchand J-L, Soulas P, Roy P, Marquant-Leguienne B, Le Bourhis D, Clément L, Salas-Cortes L, Venot E, Pannetier M, Phocas F, Klopp C, Rocha D, Fouchet M, Journaux L, Bernard-Capel C, Ponsart C, Eggen A, Blum H, Gallard Y, Boichard D, Pailhoux E, Capitan A. 2013. Novel insights into the bovine polled phenotype and horn ontogenesis in Bovidae. *PLOS ONE-Open Access Journal*, 8 (5). DOI 10.1371/journal.pone.0063512.
- Molaei MM, 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*, 6 (1): 17–22.
- National Toxicology Program. 2010. TR-550 Toxicology and Carcinogenesis Studies of Cresols (CAS No. 1319-77-3) in Male F344/N Rats and Female B6C3F1 Mice (Feed Studies).
- Negrão JA, Porcionato MA, Passillé AM de, Rushen J. 2004. Cortisol in saliva and plasma of cattle after ACTH administration and milking. *Journal of Dairy Science*, 87 (6): 1713–1718. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(04)73324-X.
- Oliver MA. 2009. ALCASADE Alternatives to castration and Dehorning, Study on the improved methods for animal-friendly production, in particular on alternatives to the castration of pigs and on alternatives to the dehorning of cattle; [www.alcasade.eu](http://www.alcasade.eu)

- Palme R. 2012. Monitoring stress hormone metabolites as a useful, non-invasive tool for welfare assessment in farm animals. *Animal Welfare*, 21 (3): 331–337. DOI 10.7120/09627286.21.3.331.
- Palme R, Rettenbacher S, Touma C, El-Bahr SM, Möstl E. 2005. Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1040: 162–171. DOI 10.1196/annals.1327.021.
- Palme R, Robia Ch, Messmann S, Hofer J, Möstl E. 1999. Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminants: a non-invasive parameter of adrenocortical function. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, (86): 237–241.
- Palme R, Touma C, Arias N, Dominchin M-F, Lepschy M. 2013. Steroid extraction: Get the best out of faecal samples. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, (100): 238–246.
- Ross LG, Ross B. 2008. *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. Oxford: Blackwell, 222.
- Salomon F-V, Geyer H, Gille U, Achilles W, Hrsg. 2015. *Anatomie für die Tiermedizin*. Dritte., aktualisierte und erw. Aufl. Stuttgart: Enke, 872.
- Sambraus HH. 2011. *Farbatlas Nutztierassen*. 263 Rassen in Wort und Bild. Siebte., erw. Ausg. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer, 336.
- Schafberg R, Swalve HH. 2015. The history of breeding for polled cattle. *Livestock Science*, 179: 54–70. DOI 10.1016/j.livsci.2015.05.017.
- Schnorr B, Kressin M. 2011. *Embryologie der Haustiere*. 14 Tabellen. Sechste., aktualisierte Aufl. Stuttgart: Enke, 276.
- Sharma JN, Srivastava KC, Gan EK. 1994. Suppressive effects of eugenol and ginger oil on arthritic rats. *Pharmacology*, 49 (5): 314–318. DOI 10.1159/000139248.
- Sigmund M. 2019. *Untersuchungen zur Cortisolkonzentration im Speichel von Ziegenkitzen welche mit unterschiedlichen Methoden enthornt wurden*. Diplomarbeit. Veterinärmedizinische Universität Wien.
- Stafford KJ, Mellor DJ. 2005. Dehorning and disbudding distress and its alleviation in calves. *Veterinary Journal*, 169 (3): 337–349. DOI 10.1016/j.tvjl.2004.02.005.
- Sutherland MA, 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. DOI 10.1016/j.applanim. 2018.03.004.
- Van Wyk BE, Wink C, Wink M. 2015. *Handbuch der Arzneipflanzen*. Ein Bildatlas. Dritte., neu bearbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 520.
- Waiblinger. 2012. *Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e.V. - Enthornen von Rindern*. Merkblatt 86.
- Wester VL, van Rossum EFC. 2015. Clinical applications of cortisol measurements in hair. *European Journal of Endocrinology*, 173 (4): M1-10. DOI 10.1530/EJE-15-0313.

Yuwono M, Siswandono, Hafid AF, Poernomo AT, Agil M, Indrayanto G, Ebel S. 2002. Eugenol. Elsevier, 149–177.

Zaikov A, Iliev I, Hubenova T. 2008. Induction and recovery from anaesthesia in pike (*Esox lucius* L.) exposed to clove oil. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, (14 (No 2)): 165–170.

**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.

## 10 **Abbildungsverzeichnis**

<u>Abb. 1: Eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol)</u> .....	7
<u>Abb. 2: Isoeugenol (2-methoxy-4-prop-1-enylphenol)</u> .....	9
<u>Abb. 3: Cortisol (17<math>\alpha</math>-OH Corticosteron)</u> .....	11
<u>Abb. 4: Boxplot Darstellung der Cortisolwerte</u> .....	18

## **11 Anhang**

Anhang : Cortisolkonzentrationen der Einzeltiere .....32-33

## Anhang: Cortisolkonzentration

im Speichel in Nanogramm pro Milliliter (ng/ml) von Kälbern zu den Messzeitpunkten vorher, 15 min nach und 60 min nach dem Eingriff der vier Gruppen und Tiere

Tiernummer	Isoeugenol		
	Vorher (ng/ml)	nach 15 min (ng/ml)	nach 60 min (ng/ml)
4	3,6	4,4	4,1
8	2,3	3,0	6,5
11	3,2	3,1	4,5
13	3,5	3,3	3,9
21	4,0	3,6	2,5
23	4,0	4,2	3,0
25	1,4	3,2	2,3
26	1,3	5,9	3,7
32	4,0	4,1	4,2
37	1,5	4,0	2,1

Tiernummer	Nelkenöl		
	Vorher (ng/ml)	nach 15 min (ng/ml)	nach 60 min (ng/ml)
1	3,1	5,0	6,2
10	3,1	3,8	4,2
12	6,2	6,1	4,7
19	3,1	3,1	2,8
20	3,4	4,7	4,7
22	3,0	2,6	3,7
28	4,2	6,2	4,4
36	1,7	2,8	1,8
38	1,6	4,2	5,5
40	2,1	2,5	2,2

		NaCl	
Tiernummer	Vorher (ng/ml)	nach 15 min (ng/ml)	nach 60 min (ng/ml)
3	3,0	5,0	4,3
5	4,7	3,6	4,7
9	3,3	3,9	3,7
14	2,5	4,0	2,8
16	4,9	3,8	3,9
18	4,6	3,8	2,7
24	1,0	0,5	0,4
31	3,2	2,9	2,7
34	3,2	2,8	3,7
35	3,0	3,2	fehlt

		Buddex	
Tiernummer	Vorher (ng/ml)	nach 15 min (ng/ml)	nach 60 min (ng/ml)
2	2,5	2,4	3,5
6	2,3	2,0	2,9
7	1,7	1,9	3,1
15	6,5	4,6	3,9
17	1,7	2,1	2,7
27	2,9	2,7	4,0
29	3,8	4,2	4,1
30	1,5	1,5	4,2
33	2,7	3,0	3,5
39	2,9	3,2	4,9