

**Untersuchung zur Stressbelastung
von Robben (Pinnipedia) und Rindern:
Entwicklung und Validierung eines Belastungsindex**



**Dissertation
vorgelegt von
Neele Hendrika Gundlach**

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2015

© 2015 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH,**
Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-290-2

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
info@dvg.de
www.dvg.de

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Untersuchung zur Stressbelastung von Robben (Pinnipedia) und Rindern:
Entwicklung und Validierung eines Belastungsindex**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer Doktorin
der Veterinärmedizin
- Doctor medicinae veterinariae -
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von
Neele Hendrika Gundlach
Lüneburg

Hannover 2015

Wissenschaftliche Betreuung:

Frau Prof. Prof. h. c. Dr. Ursula Siebert
(Tierärztliche Hochschule Hannover,
Institut für Terrestrische und Aquatische
Wildtierforschung)

Frau JProf. Dr. Marion Schmicke
(Tierärztliche Hochschule Hannover,
Klinik für Rinder, Endokrinologisches Labor)

1. Gutachterinnen: Frau Prof. Prof. h. c. Dr. U. Siebert und Frau JProf. Dr. M. Schmicke
2. Gutachterin: Frau Prof. Dr. Sabine Kästner

Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.2015

Für Johannes & meine Familie
in Liebe und Dankbarkeit

Auszüge aus der vorliegenden Arbeit wurden bereits auf folgenden Tagungen vorgestellt:

N.H. Gundlach, M. Schmicke (Piechotta), A. Krumbholz, U. Siebert (2014)

Hair cortisol as a parameter for stress assessment in harbor seals

Posterbeitrag, 28th annual conference of the European Cetacean Society,
April 2014, Liège, Belgien

N.H. Gundlach, Y. Gundelach, M. Feldmann, F. Graubner, M. Hoedemaker, M. Schmicke (Piechotta) (2015)

Dehydroepiandrosteron (DHEA) was higher in cows with metritis – potential anti-inflammatory signal from the adrenal cortex

Kurzvortrag, 48. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung,
Februar 2015, Universität Zürich, Schweiz

N.H. Gundlach, M. Schmicke (Piechotta), E. Ludes-Wehrmeister, S.A. Ulrich, F. D. Hanke, C. Ludwig, M.A. Gil, U. Siebert (2015)

Origin of stress in phocids – is it acute or chronic?

Potential of dehydroepiandrosterone and cortisol/DHEA-ratio as markers for chronic stress

Kurzvortrag, 89th annual meeting of the German Society for
Mammalian Biology (Deutsche Gesellschaft für Säugetierkunde e.V.),
September 2015, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Zudem wurde folgendes Manuskript bereits veröffentlicht:

N.H. Gundlach, M. Schmicke (Piechotta), U. Siebert (2014)

Is lachrymal fluid a potential method for cortisol measurement in wild harbor seals?: A pilot study

International Journal of Veterinary Medicine: Research & Reports, Vol. 2014 (2014),
Article ID 967043, DOI: 10.5171/2014.967043

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	4
2.1. Definition Stress	4
2.2. Akuter Stress	9
2.3. Chronischer Stress	9
2.4. Auswirkungen von Stress	11
2.5. Bewertung der Stressantwort	13
2.5.1. Stressparameter	13
2.5.1.1. Katecholamine	13
2.5.1.2. Cortisol	14
2.5.1.3. Dehydroepiandrosteron/ Dehydroepiandrosteronsulfat	15
2.5.1.3. Cortisol/DHEA-Quotient	18
2.5.2. Untersuchungsmaterial	19
2.5.2.1. Blut	19
2.5.2.2. Speichel	20
2.5.2.3. Tränenflüssigkeit	21
2.5.2.4. Weitere Untersuchungsmaterialien	22
2.6. Stress bei marinen Säugetieren	24
2.7. Stress bei landwirtschaftlichen Nutztieren	26
3. Material und Methoden	29
3.1. I. Studie: Evaluierung verschiedener Matrices zur Beurteilung des Stressstatus bei Seehunden	29
3.1.1. Untersuchungsgut	29

3.1.2. Probenentnahme	30
3.2. II. Studie: Beurteilung des Steroidhormons Dehydroepiandrosteron bei verschiedenen Robbenarten	30
3.2.1. Gruppdefinitionen und Studientiere	31
3.2.2. Blutprobenentnahme bei Seehunden und Kegelrobben	34
3.2.3. Speichelprobennahme in habituierten Robben und gesunden Wildtieren	35
3.3. III. Studie: Bestimmung der Dehydroepiandrosteron-Konzentration bei gesunden und an Metritis erkrankten Milchkühen postpartum	36
3.3.1. Untersuchungsgut	36
3.3.2. Haltung und Fütterung	36
3.3.3. Klinische und gynäkologische Untersuchung	36
3.3.4. Blutprobennahme	37
3.3.5. Gruppdefinitionen	37
3.4. Laboranalysen	38
3.4.1. Bestimmung des Blutbildes (Robben) und der Leukozytenzahl (Milchkühe)	38
3.4.2. Endokrinologische Analysen	39
3.4.2.1. Cortisol	39
3.4.2.1.1. Cortisolextraktion aus der Tränenflüssigkeit der Robben	39
3.4.2.1.2. Cortisolextraktion aus Speichel der Robben	39
3.4.2.1.3. Analyse von Cortisol in Tränenflüssigkeit und Speichel der Robben	40
3.4.2.1.4. Cortisolanalyse aus Serumproben von Robben und Milchkühen	41

3.4.2.2. Dehydroepiandrosteronsulfat im Serum von Robben und Milchkühen	41
3.4.2.3. Dehydroepiandrosteron im Serum der Robben und Milchkühe	42
3.4.2.4. Analyse des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-I bei Robben und Milchkühen	43
3.4.2.5. Progesteron-Konzentration im Serum der Milchkühe	44
3.5. Statistische Auswertung	44
3.5.1. Evaluierung verschiedener Matrices zur Beurteilung des Stressstatus bei Seehunden (I. Studie)	45
3.5.2. Beurteilung des Steroidhormons Dehydroepiandrosteron bei verschiedenen Robbenarten (II. Studie)	45
3.5.2.1. Statistische Auswertung der Blutparameter	45
3.5.2.1.1. Belastungsindex	46
3.5.2.2. Statistische Auswertung der Cortisolkonzentrationen im Speichel	46
3.5.3. Bestimmung der Dehydroepiandrosteron-Konzentration von gesunden und an einer Metritis erkrankten Milchkühen postpartum (III. Studie)	46
3.5.3.1. Belastungsindex	47
4. I. Studie Is lachrymal fluid a potential method for cortisol measurement in wild harbor seals?: A pilot study	48
5. II. Studie Origin of stress in pinnipeds – is it acute or chronic? Potential of dehydroepiandrosterone and cortisol/DHEA-ratio as markers for chronic stress	49
5.1. Abstract	50
5.2. Introduction	51
5.3. Material and methods	52

5.3.1. Criteria for selection and definition of groups	52
5.3.2. General data	53
5.3.3. Blood sampling	53
5.3.4. Saliva sampling	54
5.3.5. Laboratory Analysis	55
5.3.5.1. Determination of differential blood counts	55
5.3.6. Endocrinological analyses	55
5.3.6.1. Cortisol in serum	55
5.3.6.2. Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) in serum	55
5.3.6.4. Dehydroepiandrosterone (DHEA) in serum	56
5.3.6.5. Insulin-like growth factor I (IGF-I) in serum	56
5.3.6.6. Cortisol in saliva	56
5.4. Statistical analysis	56
5.4.1. Stress index	57
5.5. Results	57
5.5.1. Animal data	57
5.5.2. Laboratory Analyses	58
5.5.2.1. Blood cell counts	58
5.5.3. Endocrinological results	58
5.5.3.1. Cortisol concentrations	58
5.5.3.2. Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) concentration	59
5.5.3.3. Dehydroepiandrosterone (DHEA) concentration	59
5.5.3.4. Cortisol/DHEA – ratio	59
5.5.3.5. Insulin-like growth factor I concentration	60
5.5.3.6. Salivary cortisol concentraiaon	60

5.5.3.7. Stress index	60
5.6. Discussion	61
5.7. Conclusion	65
5.8. Acknowledgements	65
6. III. Studie DHEA and cortisol/DHEA-ratio in dairy cattle – evaluation as biomarkers	
for postpartum metritis	66
6.1. Abstract	67
6.2. Introduction	68
6.3. Material and methods	69
6.3.1. Criteria for selection and clinical examination	69
6.3.2. Blood sampling	70
6.3.3. Laboratory Analysis	70
6.3.3.1. Blood cell counts	70
6.3.4. Endocrinological analyses	70
6.3.4.1. Cortisol	70
6.3.4.2. Dehydroepiandrosteron-sulfate (DHEAS)	71
6.3.4.3. Dehydroepiandrosteron (DHEA)	71
6.3.4.5. Insulin-like growth factor I	71
6.3.4.6. Progesterone	71
6.4. Statistical analysis	72
6.4.1. Stress index	72
6.5. Results	72
6.5.1. Clinical examination	72
6.5.2. Laboratory Analysis	73
6.5.2.1. Blood cell counts	73

6.5.3. Endocrinological results	73
6.5.3.1. Cortisol concentrations	73
6.5.3.2. Cortisol /DHEA – ratio	74
6.5.3.3. Dehydroepiandrosterone - sulfate (DHEAS)	75
6.5.3.4. Dehydroepiandrosterone (DHEA)	75
6.5.3.5. DHEA/DHEAS-ratio	75
6.5.3.6. Insulin-like growth factor I	75
6.5.3.7. Stress index	76
6.5.3.7. Progesterone	76
6.6. Discussion	76
6.7. Conclusion	79
6.8. Acknowledgements	80
7. Übergreifende Diskussion	81
7.1. Evaluierung verschiedener Untersuchungsmatrizes zur Feststellung der Cortisolkonzentration bei freilebenden Seehunden	82
7.2. Evaluation von Cortisol, Dehydroepiandrosteronsulfat und Dehydroepiandrosteron bei Seehunden und Kegelrobben	87
7.2.1. Untersuchungsgruppen	87
7.2.2. Cortisol	89
7.2.3. DHEAS und DHEA	91
7.2.3.1. DHEAS	92
7.2.3.2. DHEA	94
7.3. Evaluation von Cortisol, Dehydroepiandrosteronsulfat und Dehydroepiandrosteron bei Milchkühen	98
7.3.1. Untersuchungsgruppen	99

Inhaltsverzeichnis

7.3.2. Cortisol	100
7.3.3. DHEA und DHEAS	101
7.4. Gesamteinschätzung der Untersuchungsergebnisse	106
7.4.1. Entwicklung und Validierung eines Belastungsindex	108
8. Zusammenfassung	110
9. Summary	114
10. Literaturverzeichnis	118
11. Anhang	149
12. Danksagung	153

Abkürzungsverzeichnis

Neben den allgemein üblichen Abkürzungen wurden folgende Kurzformen verwendet:

ACTH	<i>Adrenocorticotropes Hormon</i>
C/D-Quotient	<i>Cortisol/DHEA-Quotient</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
cps	<i>counts per seconds</i>
CRH	<i>Corticotropin-releasing Hormon</i>
DHEA	<i>Dehydroepiandrosteron</i>
DHEAS	<i>Dehydroepiandrosteronsulfat</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
HCl	<i>Chlorwasserstoff</i>
HPA	englisch <i>hypothalamus-pituitary-adrenal-axis</i> ; <i>Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse</i>
IGF-I	englisch <i>insulin-like growth factor-I</i> ; <i>Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor- I</i>
ITAW	<i>Institut für Terrestrische und Aquatische Wildtierforschung</i>
Max	<i>Maximalwert</i>
Min	<i>Minimalwert</i>
M _{low}	<i>Milchkühe mit einer Metritis und einer Leukopenie</i>
M _{range}	<i>Milchkühe mit einer Metritis und einer Leukozytenzahl im Referenzbereich</i>
NEFA	englisch <i>non-esterified fatty acids</i> ; <i>nicht-veresterte Fettsäuren</i>
RIA	<i>Radioimmunoassay</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SAM	<i>sympathiko-adrenomedulläres System</i>
TiHo	<i>Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover</i>
VK	<i>Variationskoeffizient</i>
vs.	lateinisch <i>versus</i> ; <i>im Gegensatz zu</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Regulationsmechanismen und Interaktionen der Körperabläufe im Rahmen einer akuten und chronischen Stressantwort; modifiziert nach Chrousos (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*, 5(7), 374-381. 11

Abbildung 2: Grafische Darstellung des Konzentrationsverlaufs von Cortisol, dem Prohormon Pregnenolon und DHEA im Rahmen einer akuten und chronischen Stresssystemaktivierung; modifiziert nach Guilliams und Edwards (2010). Chronic stress and the HPA axis. *The Standard* (2), 1-12. 18

Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der Speichelprobenentnahme bei einem trainierten Seehund im „Marine Science Center“ in Rostock 35

Abbildung 4: Protokollbogen Probenentnahme erkrankte, freilebende Seehunde 149

Abbildung 5: Protokollbogen Probenentnahme habituierte und gesunde, freilebende Robben 150

Abbildung 6: Protokollbogen Probenentnahme Milchkuhe 151

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Grunddaten und Übersicht über das gewonnene Probenmaterial der Seehunde und Kegelrobben in den drei Untersuchungsgruppen 33

Tabelle 2: Blutbildergebnisse der Seehunde und Kegelrobben in den drei Untersuchungsgruppen 152

5. II. Studie: Origin of stress in pinnipeds – is it acute or chronic? Potential of dehydroepiandrosterone and cortisol/DHEA-ratio as markers for chronic stress

Table 1: Blood cell count results of the three study groups 58

Table 2: Endocrinological results of the three study groups 59

6. III. Studie: DHEA and cortisol/DHEA-ratio in dairy cattle – evaluation as biomarkers for postpartum metritis

Figure 1: Number of leukocytes/ μl of the three study groups healthy (H), metritis with normal leukocytes counts (M_{range}) and metritis with leucopenia (M_{low}) 73

Figure 2: Concentrations of dehydroepiandrosterone (DHEA, ng/mL) in healthy (H) cows, and cows suffering from metritis with normal white blood cell counts (M_{range}) and metritis with leucopenia (M_{low}) 75

Table 3: Parameters of the three study groups 74

Table 4: Spearman correlation of metabolic and stress parameters in healthy cows and cows with metritis..... 74

1. Einleitung

Eine akute Stressreaktion beinhaltet im Allgemeinen die körpereigenen Regulations- und Anpassungsmechanismen, um in Gefahrensituationen das Überleben des Organismus zu gewährleisten (Chrousos und Gold 1992, Bartlett 1998). Vermittelt werden diese Mechanismen der akuten Stresssystemaktivierung dabei hauptsächlich über die Hormone der Nebenniere (Wingfield et al. 1997), die Katecholamine (Noradrenalin und Adrenalin) und Cortisol. Dabei wird die Reaktion des Körpers, auch als Stressantwort bezeichnet, endokrinologisch vor allem durch die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-(HPA) Achse gesteuert. Eine Beeinflussung dieser Stressachse kann sowohl durch körpereigene Regelmechanismen als auch äußere Einwirkungen erfolgen (Haddad et al. 2002). So kann bereits das Handling zur Probenentnahme bei vielen Tierarten eine akute Stressreaktion auslösen. Darüber hinaus kann eine chronische Aktivierung dieses Stresssystems zu einer „Überbelastung“ (McEwen und Wingfield 2003) und einer „Erschöpfung“ (Koolhaas et al. 2011) der entsprechenden Anpassungsmechanismen führen. Hierbei können neben physiologischen auch pathologische Veränderungen im Organismus auftreten. Mögliche Beispiele sind Änderungen des Stoffwechsel- und Kreislaufsystems oder der immunologischen Abläufe, die in der Folge mit einer erhöhten Anfälligkeit für Krankheiten einhergehen können (McEwen und Stellar 1993, Tamashiro et al. 2011). Als chronische Stressoren gelten zum Beispiel verschiedene Änderungen der Umweltsituation (Evans 1984, Swietlik 2008). So zählen im Bereich der marinen Wildtierforschung umweltbedingte Einflüsse, wie Lärm und eine zunehmende Einschränkungen des Lebensraums, durch zum Beispiel die Ausweitung der Schifffahrt (Jansen et al. 2010) sowie der Ausbau der Offshore Windparks (Simmonds und Dolman 2008), zu den potentiellen Stressoren. Solche anthropogenen Interaktionen können hierbei unter anderem eine chronische Stresssystemaktivierung hervorrufen, welche aufgrund einer möglichen Überbelastung der körpereigenen Anpassungsmechanismen mit einer erhöhten Inzidenz verschiedener Erkrankungen assoziiert sein kann (Wright et al. 2007, Müller et al. 2013).

Auch in der aktuellen Diskussion zur Beurteilung des Tierwohls, zum Beispiel in der Haltung landwirtschaftlicher Nutztiere, liegt ein Hauptaugenmerk auf der Einschätzung einer möglichen Stressbelastung. Denn landwirtschaftliche Nutztiere sind ebenfalls einer Vielfalt potentieller Stressoren ausgesetzt (Drackley 2006). Neben haltungsbedingten Einschränkungen ist hierbei auch der steigende Anspruch an die metabolische Leistungsfähigkeit (Pryce et al. 2004) zu nennen. Milchkühe erfahren so, beispielsweise in der

Folge einer hohen Milchproduktion, eine zunehmende Stoffwechselbelastung und leiden häufiger, gerade in der Phase nach der Geburt, an metabolisch bedingten Produktionskrankheiten (Rauw et al. 1998, Mulligan und Doherty 2008).

Bisherige Untersuchungen zur Quantifizierung des Stressstatus beruhen meist auf der quantitativen Bestimmung der adrenalen Stresshormone Adrenalin, Noradrenalin und Cortisol. Hierbei gilt es zu bedenken, dass, wie bereits erwähnt, die Beprobung an sich allerdings zu einem Anstieg dieser Stresshormone führen kann (Mormède et al. 2007, Sheriff et al. 2011). Eine zuverlässige Abgrenzung einer solchen akuten von einer möglichen chronischen Stressantwort gewinnt somit zunehmend an Bedeutung. Es gibt daher einen stetigen und aktuell steigenden Bedarf an verlässlichen Stressparametern zur objektiven Einschätzung der Stressbelastung eines Individuums. Hierbei wird seit längerem vermehrt nicht nur auf die Bestimmung der Hormone selbst, sondern auf die Ermittlung des Einflusses und der Folgen der Stresshormonaktivität im Organismus eingegangen (Elenkov und Chrousos 1999, McEwen 2008). In diesem Zusammenhang rückt auch das Steroidhormon Dehydroepiandrosteron (DHEA) als funktioneller Antagonist von Cortisol (Parker und Baxter 1985, Clerici et al. 1997) in den Fokus aktueller Studien. So ist bekannt, dass DHEA einerseits als Vorläufer der Sexualhormone fungiert, andererseits aber auch antiglukokortikoide Wirkungen, insbesondere als Immunmodulator (Kalimi et al. 1994, Chen und Parker 2004), aufweist. Zudem konnte bisher vor allem in humanmedizinischen Studien gezeigt werden, dass eine akute Stressreaktion zu einer Steigerung der Cortisol- und DHEA-Konzentrationen führte (Lennartsson et al. 2012). Hingegen zeigte sich eine stabile Reduktion der DHEA-Werte in der Folge einer länger andauernden Stresssituation, die auch durch das Auftreten erneuter akuter Stressoren nicht zu beeinflussen war (Parker und Baxter 1985, Opstad 1994, Guillems und Edwards 2010).

Ziel dieser Arbeit ist es daher bereits etablierte wie auch neue Parameter und Materialien zu validieren. Zur Evaluation sollen in dieser Dissertation zwei grundlegend verschiedenen Säugetierspezies, Robben und Milchkühe, näher untersucht werden. Die hierbei zugrunde gelegte Hypothese ist, dass eine chronische Stresssystemaktivierung mit einer erhöhten Krankheitsanfälligkeit assoziiert sein kann. So wird angenommen, dass die in menschlicher Obhut lebenden Robben durch die Probenentnahme keiner Stressbelastung ausgesetzt sind im Gegensatz zu den freilebenden, gesunden Seehunden. Im Vergleich hierzu erfolgt die Untersuchung von erkrankten, freilebenden Seehunden, die vermeintlich chronischen, anthropogenen Stressoren unterlegen waren.

Des Weiteren werden postpartal gesunde und an einer Metritis erkrankte Milchkühe unter der Annahme untersucht, dass eine chronische Stressbelastung zu einer höheren Inzidenz von entzündlichen Produktionserkrankungen in der postpartalen Phase führen kann.

DHEA soll dabei als situationsunabhängiger Parameter evaluiert werden. Zudem wird der Cortisol/DHEA-Quotient als möglicher Marker für die Einschätzung der Aktivierung der Stressachse untersucht. Anschließend wird geprüft, ob die analysierten Parameter als Teil eines Belastungsindex eingesetzt und bei den verschiedenen Spezies angewendet werden können, um den Wechsel einer akuten zu einer chronischen Stressantwort, sowie den möglichen Einfluss einer chronischen Stressbelastung auf den Organismus, zuverlässig anzuzeigen.

2. Literaturübersicht

2.1. Definition Stress

Der Terminus Stress bezeichnet eine durch äußere und innere Stimuli beziehungsweise Stressoren ausgelöste Reaktion eines Organismus (Stressantwort). Diese Stressantwort führt, zu temporären wie auch permanenten Veränderungen der Körperfunktionen mit dem Ziel der Wiedererlangung der Homöostase des Organismus (Cannon 1932).

In der Vergangenheit wurde Stress schlicht als nicht-spezifische Antwort des Körpers auf einen „schädlichen Stimulus“ definiert (Selye 1950, Selye und Fortier 1950). Jedoch ist heute bekannt, dass stressbedingte Veränderungen zum Erhalt und zur Wiederherstellung („Allostase“; Sterling und Eyer 1988) des Gleichgewichts der Körperfunktionen („Homöostase“; Cannon 1932) ebenfalls im Rahmen physiologischer Anpassungsleistungen stattfinden und hier auch notwendig sind. Zudem stellt sich die entsprechende „Stressreaktion“ des Organismus sehr viel komplexer und mit nachfolgenden, vielschichtigen Regulationsmechanismen (Chrousos und Gold 1992) verbunden dar, als man bisher vermutete.

Verhaltensbiologisch werden Stressoren und deren Folgen in zwei Bereiche unterschieden und zwar in die Änderungen des so genannten „regulatorischen Bereichs“ und den durch Stress verursachten Einfluss auf die individuelle „Adaptationskapazität“ (Koolhaas et al. 2011). Der regulatorische Bereich bezieht sich dabei auf die Umweltbedingungen eines Individuums oder einer Spezies, innerhalb derer Regulationsprozesse adäquat ablaufen. Diese Umweltbedingungen schließen beispielsweise Temperaturwechsel, Nahrungssuche sowie soziale Interaktionen mit ein. Laut Wingfield (2008) kann dieser Bereich allerdings zusätzlich eingeschränkt werden. Solch ein Einfluss kann durch beispielsweise eigene vorangegangene Erfahrungen, Alter, Geschlecht oder auch die körperliche Kondition bedingt sein.

Der Begriff der Adaptationskapazität hingegen bezieht sich laut Koolhaas et al. (2011) auf das Individuum selbst und beinhaltet Prozesse innerhalb des zentrale Nervensystems, der peripheren Körperfunktionen und des Verhaltens. Die Autoren erläutern, dass sich in nicht gestressten, gesunden Lebewesen die individuelle Adaptationskapazität und der regulatorische Bereich meist überschneiden und ergänzen. Das heißt, Veränderungen der Körperfunktionen finden hierbei innerhalb einer individuellen Kapazität statt und überschreiten nicht die Grenzen des regulatorischen Bereichs. Allerdings können die Verschiebung des regulatorischen Bereichs und auch die Verminderung der Adaptationsfähigkeit im Rahmen einer Stressreaktion unabhängig voneinander stattfinden. So kann eine reduzierte körperliche

Kondition als Stressor fungieren und zur Verschiebung des regulatorischen Bereichs führen, ohne dass es zu Veränderungen der Adaptationskapazität kommt (Koolhaas et al. 2011). Hingegen können zum Beispiel mangelnde Fettreserven bei abnehmenden Temperaturen, wobei letztere innerhalb des regulatorischen Bereichs liegen, zu einem Übersteigen der individuellen Adaptationskapazität führen (Koolhaas et al. 2011). In einer Untersuchung zu dem Rückgang der Population des Stellerschen Seelöwens (*Eumetopias jubatus*) im Golf von Alaska und den Aleuten-Inseln in den Jahren 1970-1990 vermuteten Trites und Donnelly (2003) ebenfalls das Auftreten von „Ernährungsstress“ als mögliche Ursache. So könne die veränderte Qualität der Beutezusammensetzung, bei unveränderten Umweltbedingungen und gleichbleibender Beutemenge, zu einer Minderung der Adaptationsmechanismen geführt haben. Als mögliche Folgen nannten Trites und Donnelly (2003) neben der verminderten Reproduktionsrate eine Abnahme der Körpergröße wie auch eine erhöhte Mortalitätsrate der Juvenilen und Jungtiere, die zu einem Rückgang der Population führte.

Die Auslöser der Stresssystemaktivierung und der nachfolgenden Stressantwort werden in Stimuli und Stressoren unterteilt (Koolhaas et al. 2011). Kontrollierbare und vorhersagbare Stimuli können hiernach zwar eine Änderung der Körperabläufe und des Verhaltens verursachen, haben jedoch meist keine pathologischen Auswirkungen auf den Organismus. Im Gegensatz dazu gelten Stressoren nach Romero (2004) als nicht vorhersagbar, potentiell schädlich und sie sind laut Koolhaas et al. (2011) zudem nicht kontrollierbar. Stressoren können, im Gegensatz zu den Stimuli, eine Veränderung der Adaptationskapazität wie auch eine Verschiebung des regulatorischen Bereichs verursachen (Koolhaas et al. 2011). Nachfolgend kann entweder eine Anpassungsreaktion oder eine „allostatische Überbelastung“ des Individuums auftreten (McEwen und Stellar 1993, McEwen und Wingfield 2003). Bleibt das entstehende Ungleichgewicht zwischen Adaptationskapazität, regulatorischem Bereich und Anforderung an das Individuum bestehen, können sich hieraus, neben einer initialen Maladaptation der Körperfunktionen, auch pathologische Veränderungen entwickeln (Wingfield 2003, Koolhaas et al. 2011).

Gleichbleibende, sich wiederholende und nicht schädliche Stimuli oder Stressoren können zudem zu einer „graduellen Abnahme“ (Koolhaas et al. 2011) der Stressantwort führen. Thorpe (1944) nannte diese Reaktion des Organismus eine der „einfachsten Lernreaktionen“ und definierte diese als „Habituation“. Die Neurobiologen Thompson und Spencer (1966) beschrieben in ihrer Arbeit die Habituation als „einfaches, nicht-assoziatives Lernen“, wodurch die Ausprägung der Antwort auf einen „spezifischen Stimulus“ aufgrund einer

„wiederholten Exposition“ abnimmt. Walker et al. (2006) untersuchten hierzu den Einfluss eines regelmäßigen Mensch-Tier-Kontakts auf das Verhalten und die Corticosteronkonzentrationen von Magellan-Pinguinen (*Spheniscus magellanicus*) in einem Reservat in Argentinien. Die Autoren konnten zeigen, dass bereits fünf Tage nach Beginn eines regelmäßigen Kontakts zu Menschen, eine Abnahme der abwehrenden Kopfbewegung sowie der Corticosteronwerte im Plasma festzustellen waren. Die Autoren deuteten diese Ergebnisse als erfolgte Habituation an den Stressor „menschlicher Umgang“. Infolge des Einfangens und der Probennahme zeigten zudem Pinguine, die in einem dauerhaft touristisch genutzten Gebiet lebten, einen geringeren Anstieg der Corticosteronlevel als Tiere, die in einem ungestörten, touristenfreien Bereich untergebracht waren.

Unabhängig von der Art des Auslösers führt jede Aktivierung des Stresssystems zu einer Anpassung des Organismus durch Veränderungen der Körperabläufe, um die Aufrechterhaltung physiologischer Abläufe zu sichern. Diese Veränderung der Körperabläufe wird als „Allostase“ bezeichnet. Laut Sterling und Eyer (1988) umfasst der Begriff Allostase demnach die „Prozesse zur Wiedererlangung der Stabilität durch Veränderungen“. Grundlegend für diese Änderungen durch die Stressreaktion ist die Stimulation des sympathiko-adrenomedullären Systems sowie der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse, *englisch* hypothalamus-pituitary-adrenal-axis). Diese endokrinen Systeme werden auch als Hauptachsen der Stressantwort beschrieben (Chrousos und Gold 1992, Minton 1994). Zu den aus den endokrinen Erfolgsorganen ausgeschütteten Hormonen zählen die Katecholamine aus dem Nebennierenmark und die Glukokortikoide, insbesondere Cortisol aus der Nebennierenrinde (Wingfield et al. 1997). Erhöhte Konzentrationen gelten laut Selye (1955), neben dem hypophysären Adrenocorticotropen Hormon (ACTH), als „typische Stresserscheinungen“ und werden daher gemeinhin auch als „Stresshormone“ bezeichnet (Elenkov und Chrousos 1999, McEwen 2008). Der Großteil der Veränderungen innerhalb eines Organismus durch die Stressantwort beruht auf der Ausschüttung dieser Stresshormone (Wingfield et al. 1997). Sie werden auch häufig als Parameter zur Evaluierung des stattgefundenen Stresses in Studien eingesetzt (Nicolson et al. 1997, Verkerk et al. 1998, Möstl und Palme 2002, Romero und Butler 2007).

Neben der verhaltensbiologischen Einteilung kann die Stressantwort laut Chrousos (2009) auch in den Einfluss der Stressantwort auf das zentrale Nervensystem und die Effekte auf den peripheren Organismus, insbesondere auf bestimmte Organfunktionen und Stoffwechselabläufe, unterschieden werden. Nach Chrousos (2009) wird durch die

Stressantwort eine Steigerung zentraler Mechanismen zur Förderung der Wachsamkeit, Erregung, Kognition, Aufmerksamkeit sowie Aggressivität im Rahmen einer Stressreaktion beobachtet. Zudem erfolgt die zeitgleiche Reduktion vegetativer Funktionen wie Reproduktion und Wachstum (Sapolsky 1987, Romero und Butler 2007). Die Sauerstoffzufuhr und die nutritive Versorgung des Gehirns, des Herzens und der Skelettmuskulatur werden hingegen durch Steigerung des Katabolismus wie auch Erhöhung des Blutdrucks und der Atmung (Frieden und Lipner 1971) erhöht. Grundlegend für diese Anpassungsreaktionen sind komplexe Interaktionen zwischen dem Nerven-, Immun- und endokrinen System (Chrousos 2000). Die Intensität dieser Wechselbeziehungen ist dabei maßgeblich abhängig von der Dauer und Ausmaß der Aktivierung des Stresssystems (Romero 2004, Dallman und Bhatnagar 2010). So unterscheiden Wright et al. (2007) in einer multidisziplinären Studie zum Einfluss von anthropogenem Stress auf verschiedene marine Tierarten zwischen einer akuten und einer chronischen Stressantwort. Hiernach unterstützt die akute Stressantwort die Überlebensfähigkeit durch Regulation der physiologischen Ressourcen (Chrousos und Gold 1992, Romero und Butler 2007). Dagegen kann eine chronische Stressbelastung jedoch zu einer fehlgeleiteten Stressreaktion („allostatische Belastung“; McEwen und Stellar 1993, Romero und Butler 2007) führen, die eine Erschöpfung der Adaptationsmechanismen („allostatische Überbelastung“; McEwen und Wingfield 2003) zur Folge haben kann. Häufige Beispiele für eine chronische Stressbelastung in der Veterinärmedizin treten im Rahmen von „Umweltstress“ (Evans 1984), aber auch anthropologischen Einflüssen auf beispielsweise Wildtiere oder verschiedene Nutztierarten auf. Als Umweltstress wird jegliche Änderungen der Umweltsituation, welche als unvorhersehbare Stressoren eine Verschiebung des regulatorischen Bereichs oder der Adaptationskapazität hervorrufen, bezeichnet (Koolhaas et al. 2011). Die Wahrnehmung von Umweltstress unterliegt jedoch großen individuellen Schwankungen (Evans 1984). Mögliche Folgen sind eine nicht adäquate, beziehungsweise überschießende Stressantwort oder auch eine anhaltende Stressreaktion nach Beendigung der auslösenden Stresssituation (Koolhaas et al. 2011). Mader (2003) führt den Einfluss der klimatischen Haltungsbedingungen auf die Gesundheit und Leistungsfähigkeit von Fleischrindern als ein Beispiel für Umweltstress auf. In weiteren Studien gehen auch Young (1981) und West (2003) auf die, auch von Evans (1984) erwähnten, klimatischen Stressoren Hitze und Kälte im Nutztierbereich ein. Evans (1984) beschreibt hierbei Einschränkungen des Lebensraums oder des Platzangebots durch eine „Überbevölkerung“ (Crowding) oder Einschränkung der Fläche als möglichen, umweltbezogenen Stressor. Insbesondere in unterschiedlichen Fischarten im Rahmen der

landwirtschaftlichen Produktion wurde der Einfluss der Einschränkung des Platzangebots evaluiert. So untersuchten Tort et al. (1996) Goldbrassen (*Sparus aurata*), die über drei Wochen „Crowding“-Stress ausgesetzt waren. Die Ergebnisse zeigten, dass neben einem initialen, mittelgradigen Anstieg und späterem erneutem Abfall der Cortisolkonzentration, eine Hyperglykämie wie auch Hinweise auf eine Schwächung des Immunsystems festzustellen waren. Bereits Metz und Mekking (1984) konnten bei Maas-Rhein-Ijssel- und Holstein-Friesian-Kühen zeigen, dass eine Einschränkung des Platzangebots im Vergleich zu einer Kontrollgruppe verhaltensbiologisch zu einer initialen Zunahme des aggressiven Verhaltens untereinander und zunächst zu einer erhöhten Urinabsatzfrequenz bei rangniederen Tieren führte.

Des Weiteren werden Verschmutzungen der Umwelt zwar dem Terminus Umweltstress zugeschrieben (Evans 1984, Depledge 1998). Sie sind aber häufig durch anthropogene Einflüsse verursacht. Fair und Becker (2000) zählen demnach Lärmbelästigung, Verschmutzung durch Öl und andere Schadstoffe wie auch Einflüsse durch Fischerei zu den häufigsten anthropogenen Stressoren für marine Meeressäuger. Die Ausweitung der Städte in ländliche Bereiche stellt laut Ditchkopff et al. (2006) ein weiteres Beispiel für einen Anstieg des durch den Menschen induzierten Stressverhaltens bei terrestrischen Wildtieren dar. Ingvarsten (2006) beschreibt in einem Review den Zusammenhang von haltungsbedingtem Umweltstress und den steigenden Ansprüchen an den Stoffwechsel bei Kühen in der peri- und postpartalen Übergangsperiode. Als zugrunde liegende Ursachen für diesen metabolischen Stress (Pryce et al. 2004) führt Ingvarsten (2006) die Dysregulation der metabolischen und endokrinen Abläufe mit einer nachfolgenden Alteration des immunologischen Status auf. Ursächlich ist hierbei, laut Ingvarsten (2006), der steigende Anspruch an die Milchleistung bei laktierenden Milchkühen, welcher eine zunehmende allostatische Belastung (McEwen 1998) nach sich zieht. Übersteigt letztere die metabolische Kapazität der Kühe, erfolgte eine allostatische Überbelastung (McEwen und Wingfield 2003), die wiederum zu einer erhöhten Inzidenz von Krankheiten führen kann (Knight et al. 2000, Ingvarsten et al. 2003).

Die Einführung dieser Begriffe macht deutlich, dass es sich bei „Stress“ im Sinne einer akuten Aktivierung um eine zunächst physiologische Anpassung handelt, welche aber zu pathologischen Auswirkungen führen kann, sofern eine Adaptation des Organismus an den „Stressor“ nicht erfolgt oder nicht möglich ist (Selye 1950, McEwen und Stellar 1993, Koolhaas et al. 2011).

2.2. Akuter Stress

Eine akute Stresssituation ist definitionsgemäß eine durch einen Stimulus oder Stressor induzierte, plötzlich auftretende, zeitlich limitierte Aktivierung des Stresssystems zur Bewältigung einer aktuellen Stresssituation (Sapolsky 1987, Moberg 2000, Romero und Butler 2007, Chrousos 2009). Für die akute Umsetzung der sogenannten „Fight-or-Flight“-Antwort ist dabei vor allem das sympathiko-adrenomedulläre System verantwortlich. Unter diesem von Cannon (1932) geprägten Begriff der „Fight-or-Flight“-Antwort versteht man die unmittelbare Bereitstellung von Energie in Form von Glukose für die Zellen durch Glukoneogenese und Lipolyse (Mizock 1995, Matter et al. 2000) wie auch die Aktivierung des Herz-Kreislaufsystems und die Steigerung des Reaktionsvermögens (McEwen und Sapolsky 1995) zur Gefahrenabwehr (Bartlett 1998). Vermittelt werden diese Veränderungen der Körperabläufe hierbei über die erhöhte Ausschüttung von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark. Die im Vergleich dazu etwas verzögert einsetzende Aktivierung der HPA-Achse führt über die Ausschüttung von Corticotropin-Releasing-Hormone (CRH) aus dem Hypothalamus zur ACTH-Freisetzung. ACTH stimuliert dann die Synthese und Freisetzung von Glukokortikoiden wie Cortisol und anderer Steroide (z.B. Androstendion, Dehydroepiandrosteron) aus der Nebennierenrinde. Die Steuerung beider Systeme erfolgt hierbei über negative Feedbackmechanismen der Hormone auf den Hypothalamus beziehungsweise die Hypophyse. Fink (2000) unterscheidet bei diesen Rückkopplungsmechanismen drei sogenannte „Schleifen“ (*englisch* „Loops“) beziehungsweise Regelkreise. Über die „lange Schleife“ führt eine erhöhte Cortisolkonzentration zu einer Hemmung der Ausschüttung von ACTH im Hypophysenvorderlappen wie auch von CRH aus dem Hypothalamus. Als „kurzer Regelkreis“ wird weiter die hemmende Wirkung von ACTH auf die CRH-Ausschüttung im Hypothalamus beschrieben und der dritte „ultra-kurze Regelkreis“ beinhaltet den selbst-inhibitorischen Effekt von CRH auf die eigene Ausschüttung direkt im Hypothalamus (Fink 2000).

2.3. Chronischer Stress

Eine länger anhaltende oder in kurzen Abständen immerwiederkehrende, frequente Stresssituation kann zu einer chronischen Stresssystemaktivierung führen (Burchfield 1979, Wright et al. 2007). Die in der Literatur beschriebenen Folgen von chronischem Stress sind allerdings widersprüchlich. Ladewig (2000) bemängelt beispielsweise in diesem Zusammenhang, dass chronischer Stress meistens als ein gleichbleibender Zustand angesehen

wird. Jedoch handele es sich hierbei häufig um eine Folge sich wiederholender, akuter Stressoren. Burchfield (1979) und Ladewig (1994) unterscheiden daher den Begriff des chronisch intermittierenden Stresses, um die zeitliche Dimension deutlicher herauszustellen. Die andauernde, intermittierende Aktivierung des Stresssystems erkläre dabei die teils unterschiedlichen Beobachtungen und Auswirkungen einer chronischen Stressantwort (Abbildung 2). So kann, laut Ladewig (2000), einerseits eine Reduktion der Stressreaktion im Rahmen einer Adaptation an einen Stressor beobachtet werden. Auch in einer Studie von Cyr und Romero (2007) bei Europäischen Staren (*Sturnus vulgaris*) konnte gezeigt werden, dass eine chronische Stressbelastung durch unterschiedliche Stressoren zu einer Reduktion der Corticosteronwerte im Vergleich zu einer Kontrollgruppe führte.

Andererseits ist auch das vollständige Ausbleiben einer Änderung der Stressreaktion möglich (Ladewig 2000). Zusätzlich kann Ladewig (2000) zufolge ebenfalls eine verstärkte Stressantwort beobachtet werden, wie beispielsweise die weitere Steigerung der Cortisolkonzentration durch einen weiteren, neuen Stressor. So zeigten insbesondere Frauen, die an einer chronischen Arbeitsüberbelastung litten, beispielsweise einen deutlichen Anstieg der morgendlichen Cortisolkonzentration (Schulz et al. 1998) verglichen mit einer Kontrollgruppe. Des Weiteren kann eine chronische Stressbelastung zu der beschriebenen allostatische Überbelastung führen, die aufgrund einer Erschöpfung der Adaptation auch pathologische Auswirkungen zur Folge haben kann (McEwen und Wingfield 2003, Koolhaas et al. 2011). Grundlegend ist hierbei die anhaltende, rapide wiedereinsetzende oder überschießende Glukokortikoid-Ausschüttung mit zum Teil zeitgleicher Fehlfunktion der negativen Feedbackmechanismen (Aguilera 1994, Ladewig 2000). Als mögliche Folgen der vermehrten Freisetzung von Katecholaminen und Cortisol können nachfolgende Veränderungen des Stoffwechsels und Kreislaufs, wie auch immunologischer Abläufe auftreten (McEwen und Stellar 1993, Tamashiro et al. 2011).

Die Bestimmung des Wechsels von einer akuten zu einer chronisch intermittierenden Stressreaktion wie auch die Einschätzung der Folgen einer Stressantwort stellen dabei eine Herausforderung in der Stressforschung dar. Die genaue Bestimmung des individuellen Übergangs von der Anpassungsfähigkeit an einen Stressor in den Erschöpfungszustand der Adaptationsmechanismen („allostatische Überbelastung“; McEwen und Wingfield 2003) ist allerdings laut Koolhaas et al. (2011) für eine objektive Einschätzung einer chronischen Stressbelastung unbedingt erforderlich.

2.4. Auswirkungen von Stress

Die Folgen einer Stressantwort werden über die Wirkungen der Katecholamine und Cortisol vermittelt. Die Auswirkungen dieser Hormone auf den Organismus werden wiederum durch die genetische Variation, Alter, Ernährung und den Gesundheitszustand beeinflusst (vergleiche Chrousos (2009), Abbildung 1). In Abbildung 1 werden die Körperfunktionen aufgezeigt, die während einer akuten oder auch chronischen Stressantwort beeinflusst werden. Auch die von Ladewig (2000) beschriebene, chronische intermittierende Stresssystemaktivierung wirkt dabei über die gleichen Mechanismen (Abbildung 1). Die länger andauernde Stimulation kann zu der beschriebenen allostatischen Belastung (McEwen und Stellar 1993, Romero und Butler 2007) führen. Mögliche Folgen sind beispielsweise das Auftreten von metabolischen und immunologischen Veränderungen, wie auch in Abbildung 1 dargestellt. Kommt es zu einer Erschöpfung der Adaptationsmechanismen, können, wie bereits erwähnt, pathologische Veränderungen die Folge sein (McEwen 1998, Koolhaas et al. 2011).

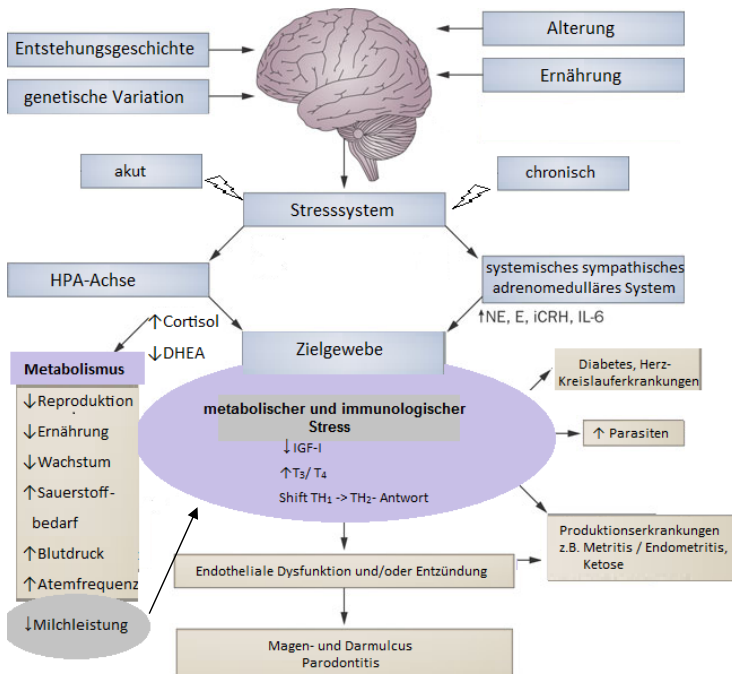


Abbildung 1: Regulationsmechanismen und Interaktionen der Körperabläufe im Rahmen einer akuten und chronischen Stressantwort; modifiziert nach Chrousos (2009). Stress and disorders of the stress system. Nature Reviews Endocrinology, 5(7), 374-381.

Den Stoffwechsel betreffend führt eine akute Aktivierung des Stresssystems zu einer Verschiebung des anabolen Metabolismus in Richtung Katabolismus, um Energie für die Stressreaktion bereitzustellen. Dies beinhaltet unter anderem die Steigerung der Herz- und Kreislauf-tätigkeit, wie auch zum Beispiel eine Erhöhung der Glukoneogenese, Proteolyse und Lipolyse (Romero und Butler 2007). Körperabläufe, die nicht zu einer Steigerung der Energiezufuhr beitragen, werden hingegen herunterreguliert. Hierzu zählen beispielsweise Wachstum (Sapolsky 1992), Reproduktion (Wingfield und Romero 2001) wie auch die Zellteilung oder die Verdauungstätigkeit des vorderen Magen- und Darmtraktes (Cannon 1916, McRae et al. 1982).

Des Weiteren erwähnte bereits Fauci (1978) einen antiinflammatorischen und immunsupprimierenden Einfluss der Glukokortikoide auf das angeborene und erworbene Immunsystem (Romero und Butler 2007). Dhabhar et al. (1995) schildern zudem eine Änderung des Verteilungsmusters der Immunzellen durch eine akute Stressreaktion, welche mit einer signifikanten Abnahme der prozentualen und absoluten Zahlen der Lymphozyten, sowie einer Zunahme der entsprechenden Neutrophilenzahlen einhergeht. Auch die direkte Regulation der Genexpression über intrazellulär gelegene, adrenale Steroidrezeptoren in den Leukozyten (Munck et al. 1978, Lippman 1978) durch Glukokortikoide konnte bereits gezeigt werden. Zudem beeinflussen Glukokortikoide die Ausschüttung bestimmter Zytokine. Bereits Daynes und Araneo (1989) stellten in einem Mausmodell fest, dass Glukokortikoide in antigen-produzierenden T-Zellen die Sekretion des T-Zell-Wachstumsfaktors Interleukin-2 (IL-2) hemmen, während die von Interleukin-4 gesteigert wurde. Auch weitere Studien mit Tieren und auch bei Menschen zeigen eine negative Beeinflussung der Glukortikoide auf die Expression proinflammatorischer Zytokine, wie Tumornekrosefaktor alpha, Interferon gamma und IL-2, sowie eine erhöhte Expression von beispielsweise antiinflammatorisch-wirkendem Interleukin-10 (Marshall et al. 1998, Franchimont et al. 1999, Curtin et al. 2009). Elenkov (2004) schlussfolgerte aus diesen Erkenntnissen, dass Glukokortikoide an der Verschiebung der T-Helferzellen-Typ-1-Antwort (TH1, zelluläre Immunität) hin zu der T-Helferzellen-Typ-2 dominierten Immunreaktion (TH2, humorale Immunität) beteiligt sind. Die zellulären Abwehrmechanismen sind jedoch unter anderem wichtig beispielsweise für die Bekämpfung von und der Rekonvaleszenz nach schwerwiegenden Infektionen wie der Mykobakteriose (Altare et al. 1998). Elenkov und Chrousos (1999) schilderten zudem einen Einfluss der vermehrten Ausschüttung verschiedener Stressmediatoren und der Zunahme der TH2-Zellantwort auf die Progression von Magenulzera. Außerdem könne die stressbedingte

Alteration der lokalen Immunantwort hierbei zusätzlich als Wegbereiter für eine *Helicobacter pylori*- Infektionen dienen.

Auch andere Körperabläufe können von einer chronischen Aktivierung der Glukokortikoid-Ausschüttung negativ beeinflusst werden. Black (2003) stellt in seiner Studie beispielsweise einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten des insulinunabhängigem Diabetes Typ-II und der Stressreaktion her. Ursache hierfür sei, neben der stressinduzierten Steigerung der Glukoneogenese und Lipolyse (Romero und Butler 2007) auch eine zunehmende Insulinresistenz des Gewebes und die Hemmung der Mobilisation von Fettreserven infolge einer chronisch Stresssystemaktivierung (Black 2003). Zudem brachten Godbout und Glaser (2006) ein reduziertes Zellwachstum und eine Minderdurchblutung sowie ein erhöhtes Risiko von Wundheilungsstörungen mit einer stressbedingten Schwächung der primär zellulären Entzündungsantwort in Verbindung. Myopathien und osteoporotischen Veränderungen (Chrousos und Gold 1992), Störungen der Fertilität (Bender 1953, Eisner 1963) sowie eine erhöhte Infektanfälligkeit wurden einer „Dysregulation“ des Immunsystems im Rahmen einer chronischen Stressantwort (Glaser et al. 2001) zugeschrieben.

2.5. Bewertung der Stressantwort

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Messung von nur einzelnen Stresshormonen, wie zum Beispiel Cortisol, unzureichend ist, um die Stressantwort eines Organismus abzubilden (Rushen et al. 2001, Rushen et al. 2011). Verschiedene Studien (Besedovsky und Rey 1996, Haddad et al. 2002, Girotti et al. 2011) belegen, dass sich insbesondere durch chronischen Stress vor allem der Metabolismus und das Immunsystem verändern. Um die Höhe einer Stressantwort beurteilen zu können, werden aktuell und auch in der hier vorliegenden Dissertation unterschiedliche Untersuchungsmaterialien verwendet, um Stresshormone oder andere Parameter zu messen. Auf die verschiedenen Stresshormone sowie unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien wird im Folgenden zunächst näher eingegangen.

2.5.1. Stressparameter

2.5.1.1. Katecholamine

Die zentrale Stimulation des sympathischen Nervensystems während einer Stressantwort führt zur Ausschüttung der Katecholamine Adrenalin (Epinephrin) und Noradrenalin (Norepinephrin) aus dem Nebennierenmark sowie aus den Varikositäten des sympathischen

Nervensystems (Romero und Butler 2007). Das aus Tyrosin gebildete Levodopa fungiert hierbei als Vorläufer von Noradrenalin, aus dem wiederum Adrenalin durch Methylierung entsteht. Die vorrangige, schnelle einsetzende Stressantwort wird über membrangebundene G-Protein-Rezeptoren vermittelt, die eine intrazelluläre, cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP)-Kaskade auslösen (Romero und Butler 2007) und zu den typischen Änderungen im Rahmen der „Fight-or-Flight“-Reaktion (Cannon 1932) führen. Hierzu zählen die Steigerung des Blutdrucks und der Herzfrequenz (McEwen und Sapolsky 1995), der Atemtiefe und die Erhöhung des Gefäßtonus, sowie der vermehrte Abbau von Glykogen und Triglyzeriden (Mizock 1995) zur Bereitstellung von Glukose als schneller Energielieferant. Der Wirkungseintritt dieser Stressantwort erfolgt laut Wingfield et al. (1997) innerhalb von Sekunden.

2.5.1.2. Cortisol

Elenkov und Chrousos (2002) zählen Cortisol, neben den Katecholaminen, zu den wichtigsten Stresshormonen. Auch Matousek et al. (2010) bezeichnen Cortisol als das bedeutendste Stresshormon im menschlichen Organismus. Es agiert zusammen mit den Katecholaminen und Zytokinen als Hauptvermittler der Stressreaktion (Matousek et al. 2010) zum Erhalt der Allostase (Sterling und Eyer 1988, McEwen 1998).

Das Glukokortikoid Cortisol wird aus dem Vorläufermolekül Cholesterol über die Zwischenstufen Pregnenolon und Progesteron gebildet. Sein inaktiver Vorläufer ist Cortison. Im Zuge der akuten Aktivierung der HPA-Achse gelangt ACTH über das Blut zur Nebennierenrinde, wo es die Bildung der Glukokortikoide, Mineralkortikoide und einiger Sexualhormonen steuert. Über die bereits erwähnten negativen Feedbackmechanismen (Kapitel 2.2.) erfolgt die Regulation beziehungsweise Hemmung des Stresssystems.

Cortisol liegt im Blut an Albumin und anderen Proteinen gebunden vor. Cortisol wird auch an einem spezifischen Transportprotein, dem Transcortin, gebunden transportiert (Gayrard et al. 1996). Seal und Doe (1966) zufolge liegt bei Seehunden 17% und bei Kühen 5% des Cortisol im Blut an Transcortin gebunden vor. Zudem sind kleinere Mengen in ungebundener, freier Form im Blut zu finden (Westphal 1963, Kirschbaum und Hellhammer 1989). Im Speichel und in der Tränenflüssigkeit hingegen ist ungebundenes, freies und damit bioaktives Cortisol messbar (Teruhisa et al. 1981, Banbury 2009).

2.5.1.3. Dehydroepiandrosteron/ Dehydroepiandrosteronsulfat

Der Vorläufer der Sexualsteroiden Dehydroepiandrosteron und seine sulfatierte Form Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEA und DHEAS) werden ebenfalls aus den Prohormonen Cholesterol und Pregnenolon gebildet. DHEA und DHEAS fungieren als Vorläufer zur Bildung von Androgen und Östrogen. Andererseits sind aber auch direkte Wirkungen von DHEA im Organismus beschrieben. Hauptbildungsort von DHEAS und DHEA ist die Zona reticularis der Nebennierenrinde (Abraham 1974, Endoh et al. 1996). Somit unterliegt die Produktion von DHEA und seines Sulfatester (DHEAS) teilweise den gleichen Aktivierungsmechanismen über ACTH wie auch die Glukokortikoide (Odell und Parker 1984). Laut Parker und Odell (1980) ist der Nachweis des ACTH-Effekts auf die DHEA-Freisetzung allerdings schwierig. Dies sei zum einen auf die hohe Basalkonzentration von konjugiertem DHEAS im Plasma zurückzuführen. Andererseits weist DHEAS eine längere Plasmahalbwertszeit als DHEA auf und hat eine geringere metabolische „Clearancerate“ (Rosenfeld et al. 1975). Zudem werden, neben der Stimulation durch ACTH, auch andere aktivierende Faktoren (Parker 1999) und weitere Produktionsorte als die Nebennieren vermutet. So stellten Cutler et al. (1979) beim Menschen fest, dass nach einer ACTH-Langzeitgabe zwar eine relativ schnelle Rückkehr von Cortisol zu den Basalwerten zu erkennen war. Die DHEA-/DHEAS-Werte blieben hingegen längere Zeit erhöht im Vergleich zur Ausgangsmessung. Des Weiteren zeigte eine ACTH-Gabe nach einer länger dauernden Nebennierensuppression in der gleichen Studie keine deutliche Aktivierung der DHEA-/DHEAS-Produktion. In der Humanmedizin und auch in Tiermodellen werden daher in verschiedenen Untersuchungen neben dem adrenalen auch die gonadale Ausschüttung aus den Ovarien beziehungsweise Hoden als Bildungsort vermutet (Abraham 1974, Purifoy et al. 1980, Longcope 1986). Überdies wurde auch die Synthese von DHEA im Gehirn beschrieben, wo es als Neurosteroid angesprochen werden kann (Baulieu 1998). Die neuronale DHEA-Bildung hat jedoch offenbar keinen nennenswerten Einfluss auf die Plasmakonzentration.

Die Sulfatierung von DHEA zu DHEAS wird nach neueren Studienergebnissen überwiegend durch die Hydroxysteroid Sulfotransferase 2A1 (SULT2A1) reguliert (Hammer et al. 2005), welche zum Großteil in der Leber, den Nebennieren und dem Dünndarm zu finden ist (Orentreich et al. 1984, Falany 1997, Saner et al. 2005). Die Desulfatierung von DHEAS zu DHEA wird hingegen von der Steroidsulfatase katalysiert, wobei DHEA die bioaktive Form ist. DHEAS wurde bislang die Hauptfunktion als Transfermolekül und Reservepool für DHEA im Blut zugeschrieben. Von der DHEAS-Konzentration wurde somit häufig auf die DHEA-Werte geschlossen. Aktuelle Studienergebnisse haben allerdings Hinweise ergeben,

dass entgegen bisheriger Annahmen keine freie, kontinuierliche Interkonversion von DHEA zu DHEAS vorliegt (Hammer et al. 2005, Sanning 2010). Hammer et al. (2005) und auch Sanning (2010) widerlegten zudem die Vermutung, dass die DHEA-Konzentration dauerhaft äquivalent zu der DHEAS-Konzentration ist. So können laut Hammer et al. (2005) physiologisch zwar vergleichbare Werte von DHEAS und DHEA gemessen werden. Unter pathologischen Bedingungen kann es aber zu einer Alteration der Aktivität der SULT2A1 kommen, die dann zu unterschiedlichen DHEA und DHEAS Konzentrationen führen kann. Sanning (2010) konnte in ihrer Studie ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen der DHEAS- und DHEA-Konzentration bei septischen Patienten im Vergleich zu gesunden feststellen. So zeigten Sepsis-Patienten deutlich höhere DHEA- jedoch erniedrigte DHEAS-Werte. Die Autoren nahmen an, dass es aufgrund der Sepsis zu einer reduzierten Expression und Bildung von SULT2A1 kam, wodurch die DHEAS-Serumkonzentration bei den septischen Patienten abnahm.

Neben der Aufgabe als Prohormon der Sexualsteroiden scheint DHEA auch eine Vielzahl an Wirkungen auf den Stoffwechsel sowie auf das Stress- und Immunsystem zu haben. So konnte in Studien potentielle neuroprotektive (Roberts et al. 1987) und antioxidative Eigenschaften von DHEA im Tiermodell (Aragno et al. 1997) und bei älteren Menschen (Araghniknam et al. 1996) nachgewiesen werden. In den letzten Jahren ist DHEA allerdings auch aufgrund der antiglukokortikoiden Funktion zunehmend Fokus von verschiedenen Untersuchungen geworden. So wird angenommen, dass DHEA-Derivate über eine Aktivierung des Androgen-Rezeptors mit dem Glukokortikoid-Rezeptor (GR) um das gleiche Hormone-Response-Element konkurrieren. Eine diskutierte Folge ist eine Verminderung der durch Glukokortikoide gesteuerten Genexpression (Rundlett und Miesfeld 1995). Zudem könnte DHEA selbst als ein kompetitiver Hemmer am GR wirken (Hazeldine et al. 2010). Eine andere Studie zeigte einen Einfluss von DHEA auf die Genexpression sowie die Aktivität der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase. Diese Enzymgruppe katalysiert unter anderem die Umsetzung von Cortison in Cortisol (Apostolova et al. 2005). So wird ein direkt und ebenfalls indirekt hemmender Einfluss von DHEA auf diese Dehydrogenase in Immunzellen vermutet (Thieringer et al. 2001, Zhang et al. 2005).

Die antiglukokortikoiden Wirkungen spiegeln sich auch in der Interaktion von DHEA und dem Immunsystem wieder. So konnte Riley (1981) bereits einen positiven Effekt von DHEA auf die Thymusinvolution, infolge einer gesteigerten Glukokortikoid-Ausschüttung, aufzeigen. Auch in pharmakologischen Studien bei Mäusen reduzierte die Vorbehandlung mit DHEA die atrophische Wirkung von Dexamethason auf den Thymus und die Milz (Blauer et

al. 1991). Die genauen Mechanismen sind bis heute unklar. So wird ebenfalls eine Wechselwirkung mit dem GR als auch ein direkter Einfluss auf den Thymusstoffwechsel über einen eigenen DHEA-Rezeptor als nicht-kompetitiver Inhibitor diskutiert (May et al. 1990). Zudem beeinflusst DHEA die Produktion und Aktivität verschiedener Zytokine. Laut einer Studie von Daynes et al. (1990) wird die Bildung des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2 im Mausmodell durch die Gabe von DHEA gefördert. Zudem konnte in der gleichen Studie gezeigt werden, dass DHEA der durch Glukokortikoide induzierten Reduktion der IL-2 Synthese entgegen wirkt. Auch Suzuki et al. (1991) konnten eine durch DHEA gesteigerte IL-2 Synthese und verstärkte zytotoxische Aktivität beispielsweise in humanen CD4+-T-Zellen feststellen. Außerdem verbesserte DHEA die Überlebensrate im Tiermodell nach verschiedenen Insulten. Sowohl in Endotoxin-vermittelten (Danenberg et al. 1992), viralen (Loria et al. 1988, Padgett et al. 1997), parasitären (Rasmussen et al. 1995) und auch bakteriellen (Ben-Nathan et al. 1999) Infektionsstudien konnte dieser positive Effekt auf die Überlebensrate nachgewiesen werden. Grundlegend hierbei scheint eine DHEA-vermittelte Aktivierung von beispielsweise IL-2, wie auch eine Reduktion proinflammatorischer Botenstoffe, wie Tumornekrosefaktor (Danenberg et al. 1992), Interleukin-6 (Straub et al. 1998) und Interleukin-1 (Ben-Nathan et al. 1999). Zudem konnten in verschiedenen Studien Hinweise auf eine direkte DHEA-Wirkung auf die Leukozytenfunktion gefunden werden. Barkhausen et al. (2006) stellten in einer Studie mit humanen Umbilikalzellen fest, dass DHEA einen unterschiedlichen regulativen Effekt auf die Adhäsionsmoleküle der Leukozytenextravasation aufwies. So beobachteten die Autoren einerseits eine Abnahme der endotheliale E-Selektin-Expression und des Intrazellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1). Andererseits konnte eine gesteigerte Expression von L-Selektin in den Leukozyten festgestellt werden. In einer durch Endotoxin induzierten Entzündung in-vivo schien DHEA zudem auf bestimmte Co-Faktoren angewiesen zu sein, die bis heute allerdings noch nicht näher bestimmt werden konnten (Barkhausen et al. 2006). In einer aktuellen Studie im Tiermodell (Al-Banna et al. 2014) wurde festgestellt, dass DHEA unter physiologischen Bedingungen die Adhäsion der Leukozyten an den Darmwandvenolen steigert. Während einer experimentell verursachter Sepsis und Endotoxämie hingegen stellten Al-Banna et al. (2014) eine DHEA-induzierte Reduktion der Leukozytenadhäsion fest.

In verschiedenen humanmedizinischen Studien konnte zudem ein deutlicher Abfall der DHEA-Konzentrationen nach einer länger anhaltenden Stresssystemaktivierung (Parker und Baxter 1985) nachgewiesen werden. Auch Guilliams und Edwards (2010) beschreiben eine

Abnahme der DHEA-Konzentration beim Menschen im Rahmen einer massiv gesteigerten Antwort der HPA-Achse aufgrund einer chronischen Stressreaktion (Abbildung 2). Hierbei führe die vermehrte Ausschüttung von ACTH aus dem Hypothalamus zu einer Zunahme der Cortisolbildung aus dem Vorläufer Pregnenolon, wodurch eine Reduktion der DHEA-Produktion zu beobachten sein. Auch Newman et al. (2013) evaluierten den Einsatz von DHEA als einen Marker für eine chronische Stressbelastung bei dem Singvogel Singammer (*Melospiza melodia*). Dabei konnten die Autoren unter anderem feststellen, dass in der Brutsaison eine länger andauernde Anwesenheit eines Räubers zu einem deutlicher Abfall der DHEA-Werte führte.

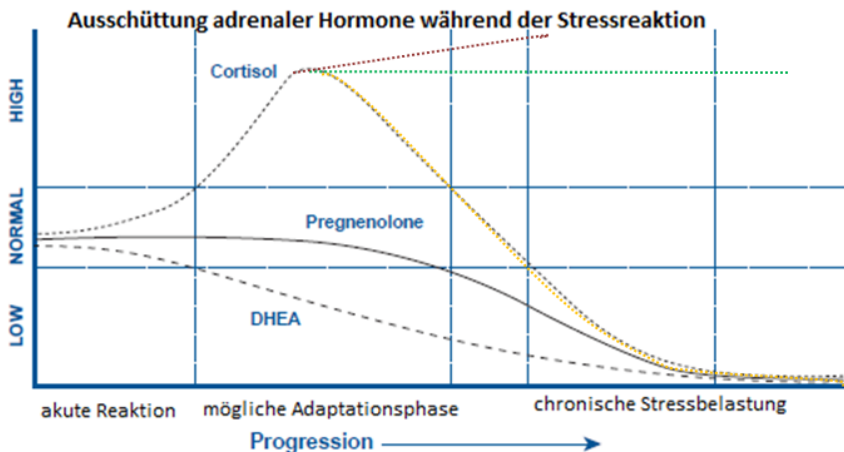


Abbildung 2: Grafische Darstellung des Konzentrationsverlaufs von Cortisol, dem Prohormon Pregnenolon und DHEA im Rahmen einer akuten und chronischen Stresssystemaktivierung; die rote Linie zeigt die Zunahme der Cortisolkonzentration, die grüne Linie das Ausbleiben einer Konzentrationsänderung und die gelbe Linie eine Abnahme der Cortisolkonzentration als Reaktion auf eine chronisch intermittierende Stressbelastung (Ladewig 2000); modifiziert nach Guilliams und Edwards (2010). Chronic stress and the HPA axis. The Standard (2), 1-12.

2.5.1.3. Cortisol/DHEA-Quotient

Cortisol, als einer der Hauptvermittler der Stressantwort (Matousek et al. 2010), spiegelt den gegenwärtigen Aktivierungszustand des Stresssystems wider. Des Weiteren kann Cortisol supprimierend auf das Immunsystem wirken. So kann dieses Glukokortikoid zum Beispiel bei Rindern zu einer dosisabhängigen Suppression der Lymphozyten-, Makrophagen und Neutrophilenfunktion führen (Roth 1985).

Hazeldine et al. (2010) konnten hingegen zeigen, dass DHEA einige dieser Wirkungen von Cortisol über direkte und indirekte Mechanismen antagonisiert. DHEA stellt somit, aufgrund seines antiglukokortikoiden Wirkungspotentials, einen potenten Gegenspieler zu Cortisol dar (Parker und Baxter 1985). Der Cortisol/DHEA (C/D)-Quotient könnte, laut Almeida et al. (2008), womöglich eine höhere Aussagekraft für die Evaluation einer Stressantwort aufweisen als die alleinige Bestimmung der Cortisolkonzentration. So findet der C/D-Quotient, beispielsweise als zusätzliches diagnostisches Hilfsmittel bei klinischen Psychologiestudien in der Humanmedizin vielseitigen Einsatz (Ritsner et al. 2004, Gallagher et al. 2007). Bei älteren Menschen (Butcher et al. 2005) und auch bei Kühen (Almeida et al. 2008) wurde der Quotient bisher vor allem als Entzündungsmarker eingesetzt. So schlussfolgerten die Autoren, dass eine Zunahme des C/D-Quotienten auf eine Schwächung des Immunsystems hinweisen könne. Nähere Untersuchungen bei Meeressäugern oder landwirtschaftlichen Nutztieren sind bisher kaum in der Literatur beschrieben und daher Gegenstand der hier vorliegenden Dissertation.

2.5.2. Untersuchungsmaterial

2.5.2.1. Blut

In den meisten Studien wird die Untersuchung unterschiedlicher Stressparameter im Blut durchgeführt und gilt als Goldstandard zur Evaluierung von akutem Stress beim Menschen (Möstl und Palme 2002). In der Veterinärmedizin ist die Entnahme von Blutproben, neben dem direkten Umgang mit den Tieren, immer mit der Fixation sowie einer physischen Bewegungseinschränkung des wachen Tieres verbunden. So konnte in vielen Studien belegt werden (Moe und Bakken 1996, Cook et al. 2000, Mormède et al. 2007), dass diese Maßnahme bereits eine akute Stresssituation darstellen kann. Auch Sheriff et al. (2011) geben zu bedenken, dass das Fangen und Fixieren von insbesondere wildlebenden Tieren die „tatsächlichen basalen Stressprofile“ verändern. Bei landwirtschaftlichen Nutztieren konnte ein Einfluss des Blutentnahmeprotokolls auf die verschiedenen Stresshormone gezeigt werden. So stellten Hopster et al. (1999) fest, dass bei Milchkühen, die an die Probenentnahme gewöhnt wurden, niedrigere Cortisolkonzentrationen gemessen werden konnten als bei Kühen, die nicht daran habituiert waren. Eine wiederholte Punktion der *Vena jugularis* bei nicht habituierten Tieren führte demnach zu einem deutlichen Anstieg der Cortisolwerte. Cook et al. (2000) heben ebenfalls hervor, dass es notwendig ist mögliche „Artefakte“, die durch invasive Maßnahmen hervorgerufen werden, zu vermeiden. Des

Weiteren empfehlen die Autoren, in „hands-on“ Studien trainierte Tiere einzusetzen oder die zeitgleiche Beprobung einer Kontrollgruppe durchzuführen. Mormède et al. (2007) nennen zudem die schnelle Durchführung der Blutentnahme, vor der Aktivierung der HPA-Achse, innerhalb der ersten Minuten nach dem Einfangen des Tieres als weitere Möglichkeit, durch den Entnahmestress unbeeinflusste Werte zu erhalten. Auch die Probenentnahme über einen zuvor eingesetzten Venenkatheter soll, laut Mormède et al. (2007) helfen, die situationsabhängige Stimulation der Katecholamin- und Glukokortikoidausschüttung zu minimieren.

2.5.2.2. Speichel

In der aktuellen Stressforschung gilt die Gewinnung von Speichel als eine weniger invasive Methode im Rahmen der Stresshormonuntersuchung (Vining et al. 1983, Lutz et al. 2000, Contreras et al. 2004). Speichel stellt ein Ultrafiltrat des Bluts dar. Cortisol liegt als ungebundene, freie und biologisch aktive Form im Speichel vor (Teruhisa et al. 1981). Änderungen der Cortisol-Konzentrationen spiegeln sich zeitlich versetzt im Speichel wider (Kirschbaum und Hellhammer 1989). Hernandez et al. (2014) konnten einen zeitverzögerten Anstieg von Cortisol im Speichel von Milchkühen feststellen. Als Stressor wurde hier die Trennung der Mutterkühe von ihren Kälbern sowie gleichaltriger Kälber voneinander verwendet. Neben einer guten Korrelation zwischen den Serum- und Speichelwerten konnten die Autoren einen um 10 Minuten verzögerten Anstieg der Cortisolkonzentrationen im Speichel nachweisen. In einer weiteren humanmedizinischen Studie von Kirschbaum und Hellhammer (2000) zeigten die Speichelcortisolwerte in Ruhe zumeist ebenfalls eine gute Korrelation mit den Serumwerten. In Stresssituationen stellten sie allerdings nur eine moderate Korrelation zwischen den Cortisolkonzentrationen im Blut und Speichel fest. Diese Beobachtungen aus der Humanmedizin konnte auch in einer Stressstudie zu dem Vergleich von Cortisolwerten in Blut, Speichel und transdermalems Exsudat bei Schafen gezeigt werden (Cook 2002). Ferner werden im Speichel, im Vergleich zum Serum, meist niedrigere Cortisolwerte detektiert (Banbury 2009). Kirschbaum und Hellhammer (1989) geben zu bedenken, dass bei einer vergleichenden Analyse der Speichel- und Serumcortisolwerte darauf zu achten ist freies, ungebundenes Cortisol sowohl im Speichel als auch im Serum zu bestimmen.

Jedoch gibt es auch Hinweise, dass insbesondere potentielle Verunreinigungen des Speichels durch zum Beispiel Nahrung oder Stimulanzien die Aussagekraft der Untersuchungen mindern können. In einer Studie (Granger et al. 2007) zur Auswirkung einer

Blutkontamination in Speichelproben von Kindern konnte allerdings nur ein geringer Effekt auf die gemessenen Hormone nachgewiesen werden. Hingegen zeigten Schwartz et al. (1998), dass orale Speichelstimulanzien, die durch eine Ansäuerung zur Steigerung der Speichelsekretion führen, eine Störung der radioimmunologischen Cortisolmessung verursachten. Dreschel und Granger (2009) konnten in Speichelcortisolmessungen bei Hunden zeigen, dass die Vorbehandlung der Schleimhaut mit kleinen Mengen Zitronensäure lediglich zu einer unterschiedlichen Akzeptanz bei den untersuchten Hunden führte. Sie konnten hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die gemessenen Cortisolwerte feststellen. Die gleiche Studie detektierte allerdings zwischen unterschiedlichen Hunderassen eine hohe Varianz der, aus einem Seil als Trägermedium, gemessenen Werte (Dreschel und Granger 2009). Pérez et al. (2004) konnten bei Kühen ebenfalls eine hohe Variabilität zwischen verschiedenen Altersgruppen und Rassen feststellen.

2.5.2.3. Tränenflüssigkeit

Tränenflüssigkeit wurde bereits in human- und tiermedizinischen Studien zur Messung der Cortisolkonzentration und damit zur Evaluation der Stressantwort eingesetzt (Banbury 2009, Khraim 2011). Um optimale Bedingungen für die Oberfläche des Auges zu schaffen, werden die verschiedenen Schichten des Tränenfilms von unterschiedlichen okulären Drüsen bereitgestellt. Der Hauptteil der serösen Bestandteile (bis zu 95%) wird hierbei von den Tränenrüsen (Scherz und Dohlman 1975) produziert. Die Meibomschen Drüsen sezernieren hingegen die Bestandteile der oberflächlichen Lipidschicht (Grehn 2008). Der muköse Anteil der Tränenflüssigkeit wird hauptsächlich von den Goblet-Zellen der Konjunktiva bereitgestellt (Kessing 1967). Die Tränenflüssigkeit besteht dabei unter anderem aus Elektrolyten wie Natriumchlorid, Glukose und Proteinen (Van Haeringen 1981). Zudem sind auch Enzyme, wie Lysozym und Lipocalin, sowie Immunglobuline zu finden. Diese Inhaltsstoffe hydratisieren die Augenoberfläche und halten diese gleitfähig (Banbury 2009). Auch Steroidhormone wie Cortisol oder DHEA und Katecholamine sind in der Tränenflüssigkeit bereits gemessen worden (Sullivan et al. 1998, Sullivan 2004, Banbury 2009). Gerade in der Humanmedizin stellt das Sammeln von Tränenflüssigkeit eine gute Methode dar, um Proteine, Zytokinmuster oder Harnsäurekonzentrationen in unterschiedlichen Studien zu bestimmen (Fullard und Tucker 1991, Schmut et al. 2002, Wei et al. 2013). In einer weiteren humanmedizinischen Arbeit von Banbury (2009) wurde zudem die Korrelation der Cortisol- und DHEA-Konzentrationen in Serum, Speichel und

Tränenflüssigkeit untersucht. Hierzu wurden gestresste und nicht gestresste Probanden anhand eines standardisierten und in der Psychologie häufig eingesetzten Verfahrens in unterschiedliche Gruppen eingeteilt und beprobt. Die Messungen der Cortisol- und DHEA-Konzentrationen in der Tränenflüssigkeit zeigten hierbei einen signifikanten Anstieg bei den gestressten Studienteilnehmern. Zudem war eine gute Korrelation zwischen den Tränenflüssigkeits- und Speichelwerten nachweisbar. In einer Untersuchung bei Kühen konnte eine gute Korrelation von Cortisol im Serum und in der Tränenflüssigkeit während einer Stresssituation festgestellt werden (Khraim 2011). In den meisten Fällen ist es allerdings nur möglich, geringe Probenmengen an Tränenflüssigkeit aus dem Konjunktivalsack zu erhalten. Beispielsweise beschrieb Banbury (2009), dass eine Gesamtmenge zwischen 40-700 µl bei den untersuchten Patienten gewonnen werden konnte. Auch bei Pferden konnte in einer aktuellen Untersuchung von Monk et al. (2014) nur weniger als 100 µl Tränenflüssigkeit gesammelt werden. Zudem kann die Manipulation zu einer Reizung des Auges führen. Eine mögliche Leckage von Kapillaren (Banbury 2009) mit nachfolgender Verunreinigung der Tränenprobe mit Blut könne so das Ergebnis möglicherweise beeinflussen. Die Studie von Khraim (2011) zeigte allerdings eine gute Akzeptanz dieser Probeentnahmetechnik bei den untersuchten Rindern. So wurde hier während der Entnahme keine Erhöhung der Herz- oder Atemfrequenz festgestellt, wie häufig bei invasiveren Methoden, beispielsweise der Gefäßpunktion zur Blutentnahme, beobachtet werden kann.

2.5.2.4. Weitere Untersuchungsmaterialien

Aufgrund der beschriebenen möglichen Limitation beim Einsatz von Blut-, Speichel- und Tränenflüssigkeitsproben ist auch die Verwendung einiger andere Körpermaterialien zur nicht-invasiven Bestimmung des Stressstatus in der Literatur beschrieben (Palme et al. 1996, Möstl und Palme 2002).

Urin stellt, neben Kot, die Haupteliminationsroute von Cortisol dar (Hay et al. 2000). Zur Feststellung der Stressreaktion, die im Zuge eines Transports und einer Umstallung hervorgerufen wurde, evaluierten Higashiyama et al. (2007) die Cortisolmessung im Urin von Japanischen Kurzrindern. Hierbei konnte ein dreifacher Anstieg der Cortisolkonzentrationen einen Tag nach dem Transport festgestellt werden. Erhöhte Werte waren zudem bis zu einer Woche nach dem Transport im Urin nachweisbar. Die „Clearance-Rate“ von Cortisol im Urin unterliegt tierartlichen Schwankungen. Die zeitgleiche Analyse von Kreatinin, als Nierenfunktionsparameter, kann helfen, die Ausscheidung von Steroiden besser

einzuschätzen. Dies konnte beispielsweise in der Arbeit von Erb et al. (1970) bei Sauen bestätigt werden, wo die zeitliche Bestimmung von Kreatinin zur Einschätzung der Ausscheidungsrate von Steroiden hervorgehoben wurde. Der Cortisol/Kreatinin-Quotient wird außerdem als zusätzliches Hilfsmittel in der Cushing-Diagnostik bei Hunden (Stolp et al. 1983) eingesetzt. McCobb et al. (2005) testeten den Einsatz dieses Quotienten auch als „stress score“ zur Bestimmung von Haltungstress bei Katzen. Hierbei konnten McCobb und ihre Co-Autoren zwar einen morgendlichen Anstieg der Cortisolkonzentration feststellen, doch war es nicht möglich, bei einzelnen Katzen erhöhte Stresslevel verlässlich zu detektieren.

Auch der Einsatz von Kot, insbesondere in retrospektiven Studien bei Wildtieren als Instrument zur Bestimmung des Stresslevels, gewinnt an Bedeutung (Sheriff et al. 2011). Palme (2005) hebt hervor, dass Kotproben leicht zu sammeln sind. Jedoch variieren die messbaren Metabolite zwischen den Tierarten. Möstl et al. (2002) konnten beispielsweise 21 Cortisol-Zwischenprodukte bei Schafen nachweisen. Außerdem ist zu bedenken, dass sowohl Bakterien im Kot (Eriksson und Gustafsson 1970) als auch Umwelteinflüsse, wie Regen, Hitze und Kälte (Washburn und Millspaugh 2002) zu einer Veränderung der instabilen Cortisolmetabolite führen. Hierdurch kann sowohl das Ergebnis beeinträchtigt als auch der Einsatz limitiert werden. Bei der Bestimmung der Glukortikoide im Kot muss zudem die unterschiedliche Dauer der Darmpassage jeder Spezies berücksichtigt werden. So konnten Palme et al. (1996) Unterschiede in der zeitlichen Ausscheidung von radiomarkiertem Cortisol bei Ponys, Schafen und Schweinen nachweisen. Aufgrund dieser Varianzen weist Palme (2005) darauf hin, dass eine physiologische Validierung der Untersuchungsmethode, zum Beispiel mittels ACTH-Stimulationstest, für jede Tierart notwendig ist.

Zur Bestimmung einer möglichen chronischen Stressbelastung erfolgt häufig auch die Analyse von Cortisol in Haaren oder Federn. Sheriff et al. (2011) heben den Vorteil des langsamen Wachstums der Haare und Federn für die Untersuchung der Stressparameter hervor, die einen Rückblick über Wochen und Monate erlauben. So weisen Federn Banden auf, die Grubb (1989) mit verschiedenen Wachstumszyklen in Verbindung brachte. In einer aktuellen Untersuchung von Carlitz et al. (2014) über Cortisolkonzentrationen in Haaren von Orang-Utans (*Pongo* spp.) wurde ebenfalls versucht, die Cortisolwerte einzelner Haarsegmente verschiedenen beobachteten Stressexpositionen zu zuordnen. Die Autoren stellten hierbei unter anderem in den untersuchten Haaren eines Orang-Utan Weibchens, die über einem längeren Zeitraum vermehrt sozialem Stress ausgesetzt war, höhere Cortisolkonzentrationen fest verglichen mit einer Kontrollgruppe.

Die genauen Mechanismen der Aufnahme von Cortisol in das Haar konnten allerdings bisher nicht für alle Tierarten abschließend geklärt werden. Zudem müssen die unterschiedlichen Wachstumsraten der Haare (Chase 1954) und Federn beachtet werden. Daher empfehlen Sheriff et al. (2011) ebenfalls eine physiologische Methodenvollständigung für jede Tierart durchzuführen.

2.6. Stress bei marinen Säugetieren

Zu den in deutschen Gewässern vorkommenden Meeressäugern gehören neben dem Seehund (*Phoca vitulina vitulina*), die Kegelrobbe (*Halichoerus grypus*) und der Schweinswal (*Phocoena phocoena*). Im Gegensatz zu den Populationszahlen der Schweinswale (Hammond et al. 2006, Peschko et al. 2015) zeigen die Robbenpopulationen in der deutschen Nord- und Ostsee seit einigen Jahren einen leicht zunehmenden Trend (Galatius et al. 2014, Brasseur et al. 2014). Im Rahmen des Monitorings der heimischen Meeressäuger werden hierbei auch häufiger diverse Hinweise auf eine anthropogene Beeinflussung verzeichnet. Diese Interaktionen führen zu multiplen Anpassungsreaktionen und können auch eine Verschiebung des regulatorischen Bereichs nach sich ziehen (Wright et al. 2007, Koolhaas et al. 2011). Im marinen Wildtierbereich geht man davon aus, dass zunehmende anthropogene Aktivitäten wie der Bau von Offshore-Windkraftanlagen (Lucke et al. 2006), seismische und militärische Tätigkeiten, Schiffsverkehr (Herr et al. 2009), Fischerei (Northridge, 1991, Dierauf und Gulland 2001, Siebert et al. 2006), Umweltverschmutzungen (Fair und Becker 2000) und die touristische Nutzung des Lebensraums der marinen Säugetiere zu einer direkten Schädigung von einzelnen Organsystemen oder zu Habitatverlusten führen. Müller et al. (2013) vermuten zudem, dass verschiedene Stressoren neben der Beeinflussung des Verhaltens eine Beeinträchtigung des Immunsystems und somit des Gesundheitsstatus von Meeressäugern zur Folge haben.

Die Quantifizierung der Stresssystemaktivierung bei freilebenden marinen Säugetieren ist allerdings schwierig, da sowohl beigefangene, gestrandete wie auch aktiv gefangene Tiere akutem Stress ausgesetzt sind. Somit werden aussagekräftige Messung der Effekte insbesondere einer vorangegangenen chronischen Stressbelastung erschwert (Eskesen et al. 2009). Verschiedene Ansätze wurden in diesem Zusammenhang bereits verfolgt.

So zeigte eine Arbeit von Desportes et al. (2007) bei in menschlicher Obhut lebenden, trainierten Schweinswalen, dass eine Beprobung außerhalb des Wassers zu höheren Cortisolwerten führte als im Wasser. Bei einer Probennahme auf einer freiwilligen Basis und ohne Fixation innerhalb des Wasserbeckens konnten hingegen deutlich niedrigeren Cortisol-

Konzentrationen festgestellt werden. In einer weiteren Studie verglichen Fonfara et al. (2007) die stressinduzierte Beeinflussung der Zytokinmuster bei frei- sowie in menschlicher Obhut lebenden Schweinswalen. Die Autoren konnten hierbei, neben einer erhöhten Cortisolkonzentration bei aktiv gefangenen Tieren, Hinweise für eine stressbedingte Verschiebung der Zytokinmuster erkennen. Hierbei wurden vermehrt immunmodulierenden Zytokinen, wie beispielsweise Interleukin-4 und Transformierender Wachstumsfaktor β , gebildet.

Auch die Bestimmung unterschiedlicher Parameter bei jungen und erwachsenen See-Elefanten (*Mirounga angustirostris*) zeigte den Einfluss der Beprobungssituation auf den Cortisolspiegel (Champagne et al. 2012). Die beprobten See-Elefanten, die direkt im Feld sediert wurden, wiesen dabei geringere Werte auf, als längere Zeit fixierte, unseidierte See-Elefanten. Darüber hinaus zeigten transportierte, junge Studientiere, die nachfolgend sediert wurden, höhere Cortisol- und Adrenalin-Werte verglichen mit direkt fixierten, gleichaltrigen Tieren. Abschließend stellten Champagne et al. (2012) demnach fest, dass die Handlingmethode einen deutlichen Einfluss auf die Messung von Cortisol bei See-Elefanten aufweist.

Zur Feststellung des Effekt von Stress und Rangordnung auf den Testosteronspiegel von Kegelrobbenbullen (*Halichoerus grypus*) während der Fortpflanzungsperiode konnte in einer Studie von Lidgard et al. (2008) deutlich gezeigt werden, dass es zu einem Anstieg der Cortisolwerte durch das Einfangen und Fixieren der Robbenbullen kam. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch die Untersuchung zu den Auswirkungen von wiederholtem Stress auf junge Kegelrobben (Bennett et al. 2012). Diese Tiere wurden in einer Aufzuchtstation betreut und zu unterschiedlichen Zeitpunkten, entweder alle drei Tage oder im Abstand von 8-10 Tagen, dem Kontakt zu Menschen ausgesetzt. Unabhängig von der Frequenz des Tier-Mensch-Kontakts zeigten alle jungen Kegelrobben einen Anstieg der Cortisolkonzentration innerhalb der ersten fünf Minuten nach Beginn der Untersuchung. Es konnte allerdings kein dauerhafter Anstieg der Cortisollevel während der unterschiedlichen Behandlungsregime festgestellt werden. So zeigte auch der frequentere Kontakt alle drei Tage keine Änderung der basalen oder stressbedingten Cortisolwerte. Die Autoren schlussfolgerten hieraus, dass der menschliche Kontakt weder zu einer Habituation noch zu einer chronische Stressbelastung führte.

Aufgrund des nachweisbaren Einflusses der Beprobungssituation auf die Blut-Cortisolkonzentration untersuchten Mashburn und Atkinson (2004) die alternative Messung von Kotcortisolmetaboliten bei Stellischen Seelöwen (*Eumetopias jubatus*) infolge einer

akuten Stresssituation. Den Autoren gelang es, einen Anstieg der Cortisolkonzentration 30 Minuten nach einer ACTH-Injektion im Serum, sowie der Corticosteronwerte 32 Stunden *postinjectionem* im Kot festzustellen. Constable et al. (2006) konnten zudem Cortisol und Kreatinin in gefrorenem und frischen Urinproben bei in der Antarktis lebenden Weddellrobben (*Leptonychotes weddellii*) nachweisen. Die Cortisolkonzentrationen und der Cortisol/Kreatinin-Quotient zeigten hierbei keinen signifikanten Unterschied zwischen den gefrorenen und frischen Urinproben, den Alterskategorien oder den Geschlechtern. Die Autoren schlussfolgerten, dass Urin, auch im gefrorenen Zustand, eine gute nicht-invasive Methode zu Feststellung der Cortisolkonzentrationen bei Weddellrobben darstellt.

Der Einsatz des funktionellen Cortisol-Antagonisten DHEA (Parker und Baxter 1985, Guilliams und Edwards 2010) in der Stressevaluation bei Meeressäugern ist bisher noch limitiert. In einer Studie von Browne et al. (2006) konnte die Messung von DHEA im Serum von Nördlichen Seebären (*Callorhinus ursinus*) bereits erfolgreich durchgeführt werden. Hier zeigten die untersuchten weiblichen Nördlichen Seebären eine höhere DHEA-Konzentrationen während der physiologisch auftretenden Keimruhe im Vergleich zur verzögert einsetzenden Implantationsphase. Dies wurde von den Autoren als Hinweis für die Beteiligung und Regulation von DHEA an der Androgensynthese in Seebären gewertet, so dass die Autoren vergleichbare Mechanismen von DHEA in terrestrischen und marinen Säugern vermuten.

2.7. Stress bei landwirtschaftlichen Nutztieren

Die ökonomische Nutzung der unterschiedlichen landwirtschaftlichen Nutztiere stellt häufig einen Kompromiss zwischen der optimalen Wirtschaftlichkeit und dem bestmöglichen Tierschutzkonzept dar. Beispielsweise spielen für Änderungen des regulatorischen Bereichs (Koolhaas et al. 2011) die Haltungsform, Raumannsprüche der einzelnen Tierart und die Häufigkeit und Art des Mensch-Tier-Kontakts eine wesentliche Rolle. Als mögliche potentielle Stressoren sind Platzmangel oder häufiges Umstallen mit Änderungen der Gruppenzusammensetzung zu nennen (Fernandez et al. 2007). Auch eine zu hohe Besatzzahl kann dabei zu einer erhöhten Inzidenz von stressbedingten Änderungen des Verhaltens wie auch des Gesundheitsstatus führen. Boon und Wray (1989) zeigten, dass mangelnde Hygiene, ungeeignete klimatische Verhältnisse und ein steigender Infektionsdruck zu einer Reduktion des Wohlbefindens von Nutztieren und der Verminderung der individuellen Adaptationskapazität (Koolhaas et al. 2011) beitragen.

Verschiedene Ansätze wurden in unterschiedlichen Studiensetups genutzt, um eine Aussage über den Stressstatus beziehungsweise die stressinduzierten Abweichungen von landwirtschaftlichen Nutztieren zu erhalten. Bei den unterschiedlichen Nutztierarten wurde in diesem Zusammenhang Untersuchungen zu Auswirkungen von Gruppenwechsel und Rangordnung auf die Cortisolkonzentration (Ekkel et al. 1995, Hicks et al. 1998), die Effekte von negativen sozialen Interaktionen auf die Immunität (de Groot et al. 2001), sowie Einflüsse unterschiedlicher Haltungsbedingungen auf den Tagesrhythmus der Cortisolausschüttung (de Jong et al. 2000) durchgeführt. Ferner wurden Stressparameter während und nach einem Transport bei Bullen (Buckham Sporer et al. 2008a) oder Broilern (Zhang et al. 2009) gemessen und näher charakterisiert. Als Untersuchungsmaterial wurden dabei häufig Blutproben (Hicks et al. 1998, Hopster et al. 1999, Zhang et al. 2009), aber auch Speichel (Ekkel et al. 1995, de Groot et al. 2001), Urin (Hay und Mormede 1998, Higashiyama et al. 2007), Fäzes (Weiss et al. 2004), Haare (Comin et al. 2013) oder Eier von Legehennen (Royo et al. 2008) verwendet.

Allen diesen Analysen ist gemein, dass die Untersuchung lediglich eines Parameters der Stressachse nur einen Teil der eigentlichen Stressantwort abbildet. So konnten Haddad et al. (2002) aufzeigen, dass es zu beträchtlichen Interaktionen zwischen dem Nerven-, Immun- und Stresssystem im Rahmen einer Aktivierung der HPA-Achse kommt. Die Untersuchungen möglicher Folgen der Stresssystemaktivierung beziehen sich bisher allerdings weniger auf diese komplexe Interaktion, sondern größtenteils rein auf die traditionelle Messung von Cortisol (Ladewig 2000). Zudem bemängelt Ladewig (2000), dass die multiplen Auswirkungen von chronischem Stress auf die weniger „traditionellen Stresssysteme“, wie unter anderem das Immunsystem, häufig nur bruchstückhaft erforscht sind. In diesem Zusammenhang untersuchten Almeida et al. (2008) Cortisol und DHEA bei Kühen, die an einer entzündlichen, schmerzhaften Klauenerkrankungen litten und verglichen diese mit einer gesunden Kontrollgruppe. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Abnahme der DHEA-Konzentrationen und einen numerischen Anstieg der Cortisol-Werte bei erkrankten Kühen. Die Autoren schlussfolgerten, dass die niedrigeren DHEA-Konzentrationen möglicherweise die Chronizität der Erkrankungen widerspiegeln. Zudem konnte ein erhöhter Cortisol/DHEA-Quotient bei den erkrankten Kühen festgestellt werden. Almeida et al. (2008) deuteten dies als einen Hinweis auf eine Fehlregulation der endokrinologischen Abläufe.

Des Weiteren wurden in einer Studie von Marinelli et al. (2007) die Regelmechanismen von DHEA in einer kleinen Studiengruppe von Milchkühen näher untersucht. Die Autoren konnten dabei, im Gegensatz zu früherer Studien, keinen Hinweis auf einen tageszeitlich

vergleichbaren Sezernierungsrhythmus von DHEA, DHEAS und Cortisol finden. Auch zeigte sich, im Vergleich zu einer vorherigen in-vitro Studie (Higuchi et al. 1985), kein akuter Anstieg der im Plasma gemessenen DHEA-/ DHEAS-Konzentrationen nach einer ACTH-Injektion. Auch nach einem Langzeit-ACTH-Stimulationstest konnten in dieser Studie keine signifikante Änderung der DHEA-/ DHEAS-Werte nachgewiesen werden (Marinelli et al. 2007). Allerdings konnten nach dem Ende dieser Langzeit-ACTH-Gabe durchschnittlich höhere DHEA-Konzentrationen bei den untersuchten Kühen gemessen werden. Die frequente Blutentnahme zeigte hierbei keinen Einfluss auf die DHEA-Werte bei den untersuchten Kühen. Hingegen wurde ein statistisch signifikanter Einfluss der Probennahme auf die Cortisolhöchstwert festgestellt. Auch in einer weiteren Studie von Buckham Sporer et al. (2008a) wurden neben einem gegensätzlichen Verlauf der Cortisol- und DHEA-Konzentration, eine Reduktion der DHEA-Werte und die Erhöhung der Cortisolwerte während des Transports von Fleischrindern festgestellt.

Die Einsatzmöglichkeiten eines speziesübergreifenden Parameters, der akuten von chronischem Stress trennt, ist allerdings bisher nicht ausreichend beschrieben und Gegenstand dieser Dissertation.

3. Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Hauptteile. Der erste Hauptteil befasst sich mit der Bewertung verschiedener Untersuchungsmatrizes zur Evaluierung des Stressstatus in freilebenden Seehunden in der Nordsee (I. Studie).

Im zweiten Hauptteil wird der Einsatz von DHEA und des C/D-Quotienten in zwei unterschiedlichen frei- und in menschlicher Obhut lebenden Pinnipediaarten (Robben) evaluiert (II. Studie). Außerdem erfolgt die Analyse und die Einschätzung von DHEA und dem C/D-Quotienten bei gesunden und an einer Produktionserkrankung erkrankten Milchkühen *postpartum* (III. Studie). Bei beiden Tierarten erfolgte zudem die Analyse des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors-I (IGF-I) zur objektiven Einschätzung der Stoffwechsellage.

3.1. I. Studie: Evaluierung verschiedener Matrizes zur Beurteilung des

Stressstatus bei Seehunden

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden männliche und weibliche Seehunde auf einer Sandbank in der Nordsee beprobt. Ziel dieser Studie war es die Cortisolkonzentration in Tränenflüssigkeit und Speichel im Vergleich zu den Serumwerten bei wildlebenden Seehunden zu bestimmen und zu evaluieren.

3.1.1. Untersuchungsgut

In der durchgeführten Studie wurde bei 17 Seehunde (*Phoca vitulina vitulina*, 13 Männchen, vier Weibchen) im Rahmen des Gesundheitsmonitorings im Auftrag des Landesbetriebs für Küstenschutz, Nationalpark und Meeresschutz Schleswig-Holstein im April 2013 der Gesundheitszustand durch das Institut für Terrestrische und Aquatische Wildtierforschung (ITAW) der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (TiHo) untersucht (Aktenzeichen V312-72241.121-19 (70-6/07)). Hierzu wurden die Tiere auf der Sandbank Lorenzensplate (54° 25' N. 8° 39' E) vor der Schleswig-Holsteinischen Küste mittels eines Netzes gefangen (3 x 200 m) und anschließend nacheinander separat in ein Schlauchnetz verbracht. Zur eingehenden Untersuchung und Probenentnahme wurden die Seehunde anschließend einzeln manuell fixiert. Bestandteil der Untersuchung war die Aufnahme des Gewichts, der Körperlänge sowie des Geschlechts des Tieres und eine äußere klinische Untersuchung des Kopfes, der Körperoberfläche und der Extremitäten. Aufgrund der Daten zum Geschlecht, der

Körperlänge und des Gewicht wurden die Seehunde drei Alterskategorien (Hasselmeier et al. 2008) zugeordnet:

1. diesjährig (1.- 6. Lebensmonat)
2. vorjährig (7.- 18. Lebensmonat)
3. mehrjährig (älter als 18 Lebensmonate)

3.1.2. Probenentnahme

Zuerst erfolgte die Probenentnahme der Tränenflüssigkeit. Hierzu wurde äußerst vorsichtig, um die Stimulation der Lakrimation möglichst zu vermeiden, ein Wattestäbchen (Henry Schein VET GmbH, Hamburg, Deutschland) für ca. 15 Sekunden in den Konjunktivalsack eingeführt. Für die anschließende Speichelprobenentnahme wurde unter Zuhilfenahme einer Pinzette ein spezieller Wattetampon (Salivette[®], Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) für ca. 30 Sekunden in der Wangentasche belassen.

Des Weiteren wurden Blutproben aus dem kaudalen Abschnitt des extraduralen intravertebralen Venensinus entnommen. Dieser Venenplexus liegt im Wirbelkanal und befindet sich zwischen dem Periost und der *Dura mater* (Harrison und Tomlinson 1956, King 1983). Die Blutentnahme erfolgte dabei mittels auf einer 20 ml Einmalspritze (Soft-Ject[®], Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland) aufgesetzten Kanüle (1,50 x 100 mm, Supra Sonderkanülen, Ehrhardt Medizinprodukte GmbH, Geislingen, Deutschland). Das gewonnene Blut wurde anschließend direkt in ein 7,5 ml Serum- beziehungsweise in ein 2,6 ml EDTA-(Ethylendiamintetraessigsäure) Blutröhrchen (Monovette[®], Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Alle Proben wurden im Feld bis zur Weiterverarbeitung gekühlt gelagert. Das 2,6 ml-EDTA-Röhrchen wurde für die Erstellung eines kleinen Blutbildes direkt gekühlt in die Kleintierpraxis Dr. Jörg Driver in Reinsbüttel verbracht. Die übrigen Blutröhrchen wurden im Labor abzentrifugiert (10 Minuten, 3000 x g, Heraeus Multifuge 3SR, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) und das Serum, sowie die Speichel- und Tränenflüssigkeitstuffer bei -20 °C für die endokrinologische Analyse der Cortisolkonzentrationen asserviert.

3.2. II. Studie: Beurteilung des Steroidhormons Dehydroepiandrosteron bei verschiedenen Robbenarten

In der II. Studie wurde die Konzentration von Cortisol, DHEA und DHEAS im Blut von drei unterschiedlichen Tiergruppen gemessen. Die Berechnung des C/D-Quotienten erfolgte im

Anschluss. Die drei Gruppen gliederten sich in an den menschlichen Umgang gewöhnte Robben, sowie wildlebende gesunde als auch erkrankte Seehunde (Tabelle 1).

3.2.1. Gruppendefinitionen und Studientiere

Die erste Untersuchungsgruppe, im Weiteren als *habituated_zoo* bezeichnet, bestand aus an den menschlichen Umgang habituierten Kegelrobben (*Halichoerus grypus*) aus dem „Allwetterzoo“ in Münster (n=5, zwei Männchen, drei Weibchen) und Seehunden (*Phoca vitulina vitulina*, n=3, drei Männchen) des „Marine Science Centers“ des Instituts für Biowissenschaften, Lehrstuhl Sensorische und Kognitive Ökologie an der Universität Rostock. Außerdem wurden Speichelproben von Seehunden (n= 3, drei Männchen) aus dem „Zoo am Meer“ in Bremerhaven gewonnen.

Die Unterbringung der Kegelrobben in Münster, sowie der Seehunde in Bremerhaven gliedert sich in einen Außenbereich mit unterschiedlich großen Wasserbecken, sowie einem trockenen Innenbereich der Anlage. Die Seehunde des „Marine Science Centers“ hingegen leben innerhalb eines umfriedeten Areals (30 x 60 m, 2-6 m Tiefe) der Ostsee mit Anschluss an das Forschungsschiff „Lichtenberg“ im Hafenaußenbereich von Rostock-Warnemünde. Alle Robben werden mittels operanter Konditionierung trainiert, die auf einer positive Verstärkung spontan gezeigter und gewünschter Verhaltensweisen basiert. Die Blutentnahme, sowie die Speichelprobengewinnung waren dabei Teil des freiwilligen medizinischen Trainings.

Gesunde Seehunde (n=16, 13 Männchen, drei Weibchen, Tabelle 1) die während des Gesundheitsmonitorings im Auftrage des Landesbetrieb für Küstenschutz, Nationalpark und Meeresschutz Schleswig-Holstein unter der Federführung des ITAW im April 2013 untersucht und beprobt wurden (siehe auch Kapitel 3.1.1.), bildeten dabei die zweite Untersuchungsgruppe, welche im Folgenden als *wild_healthy* bezeichnet wird.

Schließlich setzte sich die dritte Gruppe (*wild_diseased*) aus freilebenden, erkrankten Seehunden (n=9, vier Männchen, fünf Weibchen, Tabelle 1) zusammen. Diese Tiere wurden anhand eines medizinischen Untersuchungsbogens von den mit der Hege und Pflege des Wildbestandes beauftragten Seehundjägern in Schleswig-Holstein als krank und nicht überlebensfähig eingestuft und folgend aus Tierschutzgründen getötet. Die Blutprobenentnahme erfolgte direkt im Anschluss. Im Rahmen des Totfundmonitorings des Landes Schleswig-Holstein wurde bei diesen Seehunden ferner eine morphologisch-

pathologische, sowie histologische, mikrobiologische und parasitologische Untersuchungen durch das ITAW und Partner durchgeführt.

Von allen untersuchten Robben wurde das Geschlecht bestimmt. Bei den freilebenden Seehunden wurde zudem das Alter geschätzt (Bestimmung nach Hasselmeier et al. 2008) beziehungsweise bei den in menschlicher Obhut lebenden Robben die Lebensjahre notiert. Des Weiteren wurde der Ernährungszustand der Seehunde und Kegelrobben anhand des Körpergewichts, der Speckdicke und der Ausbildung der Muskulatur als schlecht, mäßig oder gut eingestuft. Dies erfolgte basierend auf den Unterteilungen der *postmortem* Untersuchungen (Siebert et al. 2007). Die erhobenen Daten sind in Tabelle 1 dargestellt.

Material und Methoden

Tabelle 1: Grunddaten und Übersicht über das gewonnene Probenmaterial der Seehunde und Kegelrobben in den drei Untersuchungsgruppen (II. Studie)

Gruppe	Tierart	Beprobungsort	Geschlecht	Alter (in Jahren/ geschätzt)	Ernährungs- zustand	Blut- probe	Speichel- probe
1. <i>habituated_zoo</i>	Seehund	Rostock	männlich	15 Jahre	gut	x	x
	Seehund	Rostock	männlich	32 Jahre	gut	x	x
	Seehund	Rostock	männlich	18 Jahre	gut	x	x
	Seehund	Bremerhaven	männlich	24 Jahre	gut	-	x
	Seehund	Bremerhaven	männlich	24 Jahre	gut	-	x
	Seehund	Bremerhaven	männlich	12 Jahre	gut	-	x
	Kegelrobbe	Münster	männlich	38 Jahre	gut	x	x
	Kegelrobbe	Münster	männlich	34 Jahre	gut	x	x
	Kegelrobbe	Münster	weiblich	9 Jahre	gut	x	x
	Kegelrobbe	Münster	weiblich	27 Jahre	gut	x	x
	Kegelrobbe	Münster	weiblich	27 Jahre	gut	x	x
2. <i>wild_healthy</i>	Seehund	Lorenzensplate	männlich	mehrjährig	gut	x	x
	Seehund	Lorenzensplate	männlich	mehrjährig	gut	x	x
	Seehund	Lorenzensplate	männlich	mehrjährig	gut	x	x
	Seehund	Lorenzensplate	männlich	mehrjährig	gut	x	x
	Seehund	Lorenzensplate	männlich	mehrjährig	gut	x	x
	Seehund	Lorenzensplate	männlich	vorjährig	gut	x	x
	Seehund	Lorenzensplate	männlich	mehrjährig	gut	x	x
	Seehund	Lorenzensplate	männlich	mehrjährig	gut	x	x
	Seehund	Lorenzensplate	männlich	mehrjährig	gut	x	x
	Seehund	Lorenzensplate	männlich	mehrjährig	gut	x	x
	Seehund	Lorenzensplate	männlich	mehrjährig	gut	x	x
	Seehund	Lorenzensplate	männlich	mehrjährig	gut	x	x
	Seehund	Lorenzensplate	männlich	mehrjährig	gut	x	x
	Seehund	Lorenzensplate	weiblich	mehrjährig	gut	x	x
	Seehund	Lorenzensplate	weiblich	vorjährig	gut	x	x
	Seehund	Lorenzensplate	weiblich	mehrjährig	gut	x	x
	3. <i>wild_diseased</i>	Seehund	Sylt	männlich	diesjährig	schlecht	x
Seehund		Sylt	männlich	diesjährig	mäßig	x	-
Seehund		Sylt	männlich	diesjährig	schlecht	x	-
Seehund		Büsum	männlich	vorjährig	schlecht	x	-
Seehund		Sylt	weiblich	diesjährig	mäßig	x	-
Seehund		Sylt	weiblich	diesjährig	schlecht	x	-
Seehund		Büsum	weiblich	vorjährig	mäßig	x	-
Seehund		Büsum	weiblich	diesjährig	schlecht	x	-
Seehund		Büsum	weiblich	diesjährig	schlecht	x	-

3.2.2. Blutprobenentnahme bei Seehunden und Kegelrobben

Eine freiwillige Blutprobenentnahme bei den *habituated_zoo* Robben ist aufgrund des regelmäßigen medizinischen Trainings als Teil der regulären Gesundheitskontrolle etabliert. Im Rahmen dieses Trainings kommen die Kegelrobben und Seehunde auf Kommando aus dem Wasser auf eine Plattform und lassen sich durch Handzeichen in die Brust- oder Rückenlage verbringen. Zur Blutentnahme kann nachfolgend an den Hinterflossen manipuliert werden.

Für die Gewinnung der Blutproben wurden in dieser Studie die Venen des *Plexus plantaris* meist nach manueller Stauung plantar des Calcaneus punktiert (Wehrmeister 2014). Hierzu wurde eine auf eine 10 ml Spritze (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) aufgesetzte 20-Gauge Kanüle (0,90 x 40 mm, Sterican[®], B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verwendet. Das erhaltene Blut wurde dann unverzüglich in ein 4,9 ml Serum- sowie je ein 2,6 ml EDTA-Blutröhrchen (Monovette[®], Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Das 2,6 ml-EDTA-Röhrchen wurde für die Erstellung eines kleinen Blutbildes direkt gekühlt an die Kleintierpraxis Dr. Jörg Driver in Reinsbüttel versandt. Die anderen Proben wurden vor Ort zentrifugiert (10 Minuten, 3000 x g; EBA 20, Hettich Zentrifuge, Tuttlingen, Deutschland), der Überstand abpipettiert und das Serum für die weiteren Analysen von Insulin-ähnlichem Wachstumsfaktor-I (IGF-I), Cortisol, DHEAS und DHEA bei -20 °C eingefroren.

Die Blutprobenentnahme bei den gesunden Wildtieren der Gruppe *wild_healthy* erfolgte aus dem extraduralen intravertebralen Venensinus. Das genaue Vorgehen, die Aufbereitung und die Aufbewahrung der Proben für die Bestimmung des Blutbildes und der IGF-I-, Cortisol-, DHEAS- und DHEA- Konzentrationen sind unter Kapitel 3.1.2. beschrieben.

Bei den erkrankten Wildtieren (*wild_diseased*) erfolgte entweder die Blutentnahme aus dem extraduralen intravertebralen Venensinus, wie im Kapitel 3.1.2. bereits erläutert wurde, oder durch die intrakardiale Punktion direkt *postmortem*. Die Weiterverarbeitung und Lagerung der Proben für die Bestimmung des IGF-I, Cortisol, DHEAS sowie DHEA ist ebenfalls identisch mit den Darstellungen im Kapitel 3.1.2..

3.2.3. Speichelprobennahme in habituierten Robben und gesunden

Wildtieren

Sowohl in der *habituated_zoo* Gruppe als auch bei den *wild_healthy* Seehunden wurden Speichelproben genommen.

Die Speichelprobennahme in der *wild_healthy* Gruppe erfolgte während des Gesundheitsmonitorings im April 2013. Das genaue Vorgehen wurde bereits im Kapitel 3.1.2. beschrieben.

In der *wild_diseased* Gruppe war eine Speichelprobenentnahme aufgrund der krankheits- als auch tötungsbedingten Blutkontamination der Maulhöhle leider nicht möglich.

Bei den habituierten Robben wurde die Entnahme als Bestandteil in das tägliche Training integriert. Von den drei Seehunden des Zoos in Bremerhaven wurden hierbei einmal eine Speichelprobe vor der Fütterung sowie eine Probe nach der Fütterung gewonnen.

Wie bei der Blutprobenentnahme kamen die Tiere für die Gewinnung der Speichelprobe auf Kommando aus dem Wasser. Auf Handzeichen erfolgte das Öffnen des Mauls. Die Trainer trugen jeweils Einmalhandschuhe für die Probennahme. Der Wattetampon der Salivette® (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) wurde dann anschließend in die Wangentasche eingelegt (Abbildung 3) und dort für ca. 30 Sekunden im geschlossenen Maul belassen. Anschließend öffneten die Robben auf Handzeichen ihr Maul erneut und der Wattetampon konnte mittels einer Pinzette aus der Wangentasche entfernt werden. Die Salivette® wurde direkt in das Transportröhrchen überführt. Die Speichelröhrchen wurden anschließend bei -20 °C bis zur weiteren Aufbereitung und der anschließenden Cortisol-Analyse gelagert.



Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der Speichelprobenentnahme bei einem trainierten Seehund im „Marine Science Center“ in Rostock

3.3. III. Studie: Bestimmung der Dehydroepiandrosteron-Konzentration bei gesunden und an Metritis erkrankten Milchkühen postpartum

Die Konzentration von DHEA, DHEAS, Cortisol und IGF-I wurden bei gesunden Milchkühen und bei an einer postpartalen Metritis erkrankten Milchkühen analysiert. Der C/D-Quotient wurde anschließend aus den Ergebnissen berechnet.

3.3.1. Untersuchungsgut

Die Genehmigung dieser Studie durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit erfolgte unter dem Aktenzeichen 33.4-42502-05-14A420.

Pluripare Milchkühe der Rasse Holstein Friesian (n=37) eines Milchviehbetriebs in Wienhausen, Niedersachsen wurden im Rahmen der Bestandsbetreuung der Klinik für Rinder der TiHo untersucht und beprobt. Untersuchungszeitraum war dabei die zweite Hälfte der Transitphase direkt *postpartum* bis einschließlich drei Wochen *postpartum* (< 21 Tage).

3.3.2. Haltung und Fütterung

Die Tiere werden in einen Freilaufstall mit Spaltenboden gehalten. Die Fütterung der laktierenden Kühe in der Transitperiode *postpartum* besteht aus einer Totalen Mischration (48,4 % Grassilage und 27,7 % Maissilage) vermengt mit 10,4 % Gerstenstroh und Kraftfutter (13,6 %: Melasseschnitzel, Roggen, Raps). Zudem steht den Kühen Frischwasser ad libitum zur Verfügung.

3.3.3. Klinische und gynäkologische Untersuchung

Die allgemeine klinische Untersuchung fand stets am Vormittag zwischen 8.00 und 11.00 Uhr statt. Die Studientiere wurden hierzu von den Mitarbeitern des Betriebs bereits kurze Zeit vor der Untersuchung in einem Fressgitter fixiert. Neben der allgemeinen Untersuchung erfolgten bei jedem Tier die Beurteilung des Body-Condition-Scores (BCS; Edmonson et al. 1989, Mansfeld et al. 2000) und die Messung der rektalen Körpertemperatur. Die direkt anschließende spezielle gynäkologische Untersuchung beinhaltete die rektale palpatorische Einschätzung der Größe, Konsistenz und Symmetrie des Uterus sowie der Ovarien. Außerdem erfolgte die Beurteilung des potentiellen vaginalen Ausflusses.

In Übereinstimmung mit der Definition von Sheldon et al. (2009) für eine Metritis Grad 1, zeigten die erkrankten Kühen, zwar einen unveränderten Allgemeinzustand, jedoch einen

vergrößerten Uterus als auch Ausfluss von wässrigen, rotbraunen und übelriechenden Lochialsekreten in unterschiedlicher Menge.

Bei den gesunden Milchkühen konnten hingegen weder in der allgemeinen noch in der speziellen Untersuchung Auffälligkeiten festgestellt werden.

3.3.4. Blutprobennahme

Die Entnahme der Blutproben erfolgte vor der allgemeinen und speziellen Untersuchung. Hierzu wurde mittels einer 18-Gauge Kanüle (1,20 x 50mm, Sterican[®], B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) die *Vena coccygea mediana* punktiert und Blut in jeweils ein 9 ml Serum- und ein 9 ml EDTA-Blutröhrchen gefüllt (S-Monovette[®], Sarstedt, Nuembrecht, Germany). Die Proben wurden nach spätestens zwei Stunden bei Raumtemperatur abzentrifugiert und gekühlt.

Für die Bestimmung der Leukozytenzahlen wurde jeweils 1 ml EDTA-Blut in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt. Die weiteren Serum- und EDTA-Proben wurden anschließend für 10 Minuten bei 1500 x g zentrifugiert (EBA 20, Hettich Zentrifugen, Deutschland). Der Überstand wurde nachfolgend in 2 ml Eppendorf Gefäße (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) pipettiert und bei -20 °C für die endokrinologischen Analysen von IGF-I, Cortisol, DHEAS, DHEA und Progesteron asserviert.

3.3.5. Gruppendefinitionen

Auf der Grundlage der Befunde aus der klinischen und gynäkologischen Untersuchung und der Anzahl der Leukozyten wurden die untersuchten Milchkühe in folgende drei Untergruppen eingeteilt:

1. gesunde Kühe (H, *healthy*, n=24)
2. Kühe mit einer Metritis und Leukozytenzahlen im Referenzbereich
(M_{range}, 5-10 x 10⁶/μl, n=9)
3. an einer Metritis erkrankte Milchkühe mit einer Leukopenie
(M_{low}, <5 x 10⁶/μl, n=4).

3.4. Laboranalysen

3.4.1. Bestimmung des Blutbildes (Robben) und der Leukozytenzahl (Milchkühe)

Zur Analyse des Blutbildes der beprobten Robben wurde das Hämatologiegerät Vet abc[®] (Scil, Viernheim, Deutschland) verwendet.

Die Determination der Anzahl der Leukozyten in dem EDTA-Vollblut der Milchkühe erfolgte in einem, in der Laborroutine eingesetzten, automatisierten Hämatologiegerät (Celltac, Nihon Kohden, Bad Homburg, Deutschland).

Die Zählung der unterschiedlichen Blutzellen erfolgt bei beiden Geräten mittels Impedanzmessung. Diese Methode beruht auf der Messung der Widerstandsverhältnisse zwischen zwei über eine mikroskopisch kleine Messöffnung verbundene Flüssigkeitsräume über die eine elektrische Spannung geleitet wird. Da Blutzellen prinzipiell schlechte elektrische Leiter sind, ändert sich der gemessene elektrische Widerstand in der Lösung beim Durchtritt der Blutzelle durch die Messöffnung entsprechend des Zellvolumens (Neuerer und Hirschberger 1999).

Zu Beginn wurde die zu analysierende Blutprobe hierfür in einer an das Gerät angeschlossenen Elektrolytlösung suspendiert, somit verdünnt und durch die kapillare Öffnung eingezogen. Die Blutzellen führten nachfolgend zu einer Änderung des Widerstands. Diese Änderung war dabei proportional zum Partikelvolumen der Blutzellen.

Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die Messschwellenwerte für jede Tierart und Blutzelle unterschiedlich sind. Somit wurden in Kooperation mit der Firma Scil die Grenzwerte des Hämatologiegerät Vet abc[®] für die Untersuchung in Meeressäugerblut angepasst (persönliche Kommunikation Dr. Jörg Driver). Bei dem Celltac-Gerät der Firma Nihon Kohden ist die Tierart Rind von Herstellerseite bereits voreingestellt. Die Referenzbereiche wurden im Klinischen Labor der Klinik für Rinder, TiHo erstellt.

3.4.2. Endokrinologische Analysen

3.4.2.1. Cortisol

3.4.2.1.1. Cortisolextraktion aus der Tränenflüssigkeit der Robben

Zur Cortisolextraktion wurde das Wattestäbchen mit der Tränenflüssigkeit zunächst aus dem Transportgefäß in ein 15 ml Falconröhrchen (Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich) überführt und unter dem Abzug 2 ml eines Ethergemischs (30/70 %) aus Butylmethylether und Petroleumether (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) dazu pipettiert. Das mit Ether gefüllte Falconröhrchen wurde dann für eine Stunde bei 200 „revolutions per minute“ (rpm) auf einem Orbitalschüttler (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation des Reaktionsgefäßes in der Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) für 45 Minuten, wobei der Ether abgedampft wurde. Nach dem Zentrifugieren wurden 120 µl des 0-Standards (Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Germany) des „Enzyme Linked Immunosorbent Assays“ (ELISA) hinzugefügt und gründlich auf dem Vortexer vermischt um das Cortisol im 0-Standard zu resuspendieren. Die so aufbereitete Probe wurde bis zur weiteren Cortisolanalyse bei -20 °C eingefroren.

3.4.2.1.2. Cortisolextraktion aus Speichel der Robben

Bei der Salivette® (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) wurde das Transportröhrchen direkt für die weitere Verarbeitung genutzt. Unter dem Abzug wurden 3 ml des Ethergemischs (30/70 %) aus Butylmethylether und Petroleumether (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) in das Transportröhrchen mit der Salivette® pipettiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation für eine Stunde bei 1634 rpm auf dem Multi Reax-Schüttler (GFL 3006, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland). Das Röhrchen wurde dann in der Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) für 45 Minuten zentrifugiert. Dabei wurde der Ether abgedampft. Danach wurde der Wattetampon entfernt und 120 µl des 0-Standards des ELISAs (Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Germany) in das Transportröhrchen pipettiert. Nach dem abschließenden Vortexen erfolgte die Lagerung des extrahierten Cortisols aus den Speichelproben bei -20 °C.

3.4.2.1.3. Analyse von Cortisol in Tränenflüssigkeit und Speichel der Robben

Für die Analyse der Cortisolkonzentration in Tränenflüssigkeit und Speichel der beiden Robbenarten wurde ein kommerzieller ELISA (Cortisol free in Saliva ELISA DES6611, Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Germany) zur quantitativen Bestimmung von freiem Cortisol nach den Herstellerangaben verwendet.

Für die Durchführung des ELISAs wurden die Proben zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und für fünf Minuten bei 1000 x g (HBA 20, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert um Muzinbestandteile zu entfernen. Als erstes wurde in die mit polyklonalen anti-Cortisol-Antikörpern beschichtete Mikrotitrierplatte je 100 µl des Standards (0 – 30 ng/ml), der hohen und der niedrigen Kontrolle sowie der wie oben beschrieben aufgearbeiteten Proben in die entsprechenden Vertiefungen gegeben. Dann folgte das Zufügen von 50 µl des Enzymkonjugats (Cortisol markiert mit Meerrettichperoxidase). Die Mikrotitrierplatten wurden für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Vertiefungen kräftig ausgeschüttet und dreimal hintereinander mit je 300 µl Waschlösung gewaschen. Die verbleibende Flüssigkeit wurde durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernt. Hiernach wurden je 200 µl der Substratlösung, welche Tetramethylbenzidine (TMB) enthält, in jede der Vertiefung gegeben. Eine erneute Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde anschließend durchgeführt. Zum Stoppen der enzymatischen Reaktion wurde nach der Inkubationszeit 50 µl Stopplösung (2 N HCl) dazu pipettiert. Die Messung der Optische Dichte erfolgte innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopplösung bei 450 nm mittels eines Photometers (Sunrise™ Tecan, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Magellan™ Datenanalyse Software (Tecan Group Limited, Männedorf, Schweiz).

Laut Herstellerangaben besteht bei diesem ELISA eine getestete Kreuzreaktivität zu Prednisolon (9,69 %), zu Cortison (1,85 %) und < 1 % zu anderen Steroiden. Die analytische Sensitivität des Assays lag bei 1,4 ng/ml. Die mitgelieferte Standardkurve wurde durch die Pufferlösung verdünnt und somit die Nachweisgrenze auf 0,125 ng/ml angepasst.

Die Linearität der Verdünnung wurde mittels geometrischer Verdünnung bestätigt. Hierfür wurde eine Seehund-Probe über 10 Verdünnungsstufen 1:1 verdünnt. Die Bestimmung des Intra-Assay Variationskoeffizienten (VK) ergab für Tränenflüssigkeit 4,7 % und für Speichel 5,6 %.

3.4.2.1.4. Cortisolanalyse aus Serumproben von Robben und Milchkühen

Die Bestimmung der Cortisolkonzentration in Serum von Robben und Rindern wurde mittels eines automatisierten, kompetitiven Chemilumineszenz Immunoassays (LKCO1, Immulite™1000, Siemens Diagnostics, USA) durchgeführt.

Die Serumprobe wurde hierzu in ein Testtube verbracht und es erfolgte ein automatischer Übertrag von 25 µl der Serumprobe in das Teströhrchen des Immulite™. Dieses Teströhrchen war mit murinen monoklonalen Antikörpern beschichtet, an die das Cortisol aus der Probe bindet. Anschließend erfolgte automatisch das Entfernen des Überstands und das Waschen im Immulite™-System. Nachfolgend wurde ein zweiter Antikörper, ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper, in das Teströhrchen gegeben, welcher an den murinen Antikörper bindete. Dieser zweite Antikörper war mit alkalischer Phosphatase gekoppelt. Anschließend füllte der Automat das Substrat Adamantyl 1,2-Dioxetane-Arylphosphat in das zu messende Teströhrchen. Durch Abspaltung einer Phosphatgruppe dieses Substrats bildete sich ein instabiles Reaktionsprodukt (Adamantylidioxetan). Beim Zerfall entstand eine Lichtemission, welche in einem Photomultiplier des Immulites™ gemessen wurde und proportional zur Cortisolkonzentration in der analysierten Serumprobe war. Anhand einer im System hinterlegten Standardkurve konnte die, aus der Lichtemission in „counts per seconds (cps)“ gemessene, Konzentration von Cortisol in der Serumprobe berechnet werden.

Die analytische Sensitivität lag dabei bei 2 ng/ml. Der Inter-Assay und Intra-Assay VK belief sich auf 8,8 % beziehungsweise 4,5 % in den Proben der Robben. Für die Analyse bei den Rindern konnte ein Inter-Assay VK zwischen 6,3 % und 10,0 % und ein Intra-Assay VK zwischen 5,8 % und 8,8 % festgestellt werden.

Zudem ist eine Kreuzreaktivität zu ca. 49 % mit Prednisolon, 21 % mit Methylprednisolon, 8,6 % mit Corticosteron, 5,9 % mit Prednison und 0,2 % mit Fludocortison laut Herstellerangaben zu beachten.

3.4.2.2. Dehydroepiandrosteronsulfat im Serum von Robben und Milchkühen

Für die quantitative Messung von DHEAS wurde ein kompetitiver Radioimmunoassay (RIA DHEA sulfate, Immunotech, Beckman Coulter, Kalifornien, USA) eingesetzt. Im Doppelansatz wurden in einem mit Anti-DHEAS-Antikörpern beschichteten Probenröhrchen

25 µl der Serumprobe, der Kontrolllösung oder des Standards (in den Konzentration 10 - 1000 µg/100 ml) sowie 500 µl des ¹²⁵I-markiertem DHEAS-Tracers vermischt. Das Probenröhrchen wurden anschließend für 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad (GFL 1052, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland) inkubiert.

Nach der Inkubation wurde der Überstand dekantiert. Anschließend wurde das Teströhrchen erneut ausgeklopft und einem zweimaligen Waschvorgang unterzogen.

Die gebundene Radioaktivität wurde mittels Gamma-Counter (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) in „counts per minute (cpm)“ bestimmt. Die DHEAS-Konzentrationen konnten anschließend anhand der Standardkurve des Herstellers berechnet werden.

Der untere Messbereich wurde auf 1 µg/100 ml angepasst. Zur Bestimmung des Intra-Assay VK von 7,6 % erfolgte die zwanzigmalige Messung derselben Robben-Probe. Die Messungen der Proben der Milchkühe ergaben einen Inter-Assay VK von 10,6 % und einen Intra-Assay VK von 7,4 %.

3.4.2.3. Dehydroepiandrosteron im Serum der Robben und Milchkühe

Auch hier wurde ein kompetitiver Radioimmunoassay (DHEA RIA, Immunotech, Beckman Coulter, Kalifornien, USA) verwendet. Grundlegend hierbei ist die Konkurrenz der mit ¹²⁵I-radioaktiv-markierten und nicht-radioaktiven Antigene um die konstante Anzahl an Antikörper-Bindungsstellen.

Die Durchführung erfolgte entsprechend der Angaben des Herstellers. Es wurden 100 µl der Serumprobe, der Kontrolle oder des Standards (Konzentrationen von 0 - 30 ng/ml) mit 500 µl des Tracers (DHEA markiert mit radioaktivem ¹²⁵I), sowie 100 µl des Antiserums aus Kaninchen-anti-DHEA-Serum in das Teströhrchen pipettiert. Nachfolgend wurde alles auf einem Vortexer (IKA Vortexer 1, IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland) gründlich vermischt und eine Stunde im Wasserbad (GFL 1052, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland) bei 37 °C inkubiert. Im zweiten Schritt erfolgte die Zugabe des Präzipitationsreagenz bestehend aus Ziegen-anti-Kaninchen-Gammaglobulinserum und Puffer mit Polyethylenglykol als Präzipitat. Die Röhrchen wurden dann direkt gevortext und bei Raumtemperatur für 10 - 15 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1500 x g für 15-20 Minuten (EBA 20, Hettich Zentrifuge, Tuttlingen, Deutschland). Vor der Messung mittels Gamma-Counter (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und die Röhrchen für 15 - 30

Sekunden über einer saugfähigen Unterlage vorsichtig ausgeklopft. Die Radioaktivität in cpm wurde dann im Präzipitat mittels Gammacounter gemessen.

Die Menge des radioaktiv-markierten DHEA entsprach der umgekehrt proportionalen Konzentration des DHEA in der Probe beziehungsweise Kontrolle. Auch hier erfolgte die Bestimmung der Probenkonzentration mittels der im Testkit enthaltenen Standardkurve. Die analytische Sensitivität lag bei 0,09 ng/ml. Der Intra-Assay VK von 5,6 % für die Messungen der Robbenprobe wurde durch eine zwanzigfache Analyse einer Poolprobe errechnet. Für die Proben der Rinder ergab sich ein Inter-Assay VK von $\leq 8,6$ % und Intra-Assay VK von $\leq 3,8$ %.

3.4.2.4. Analyse des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-I bei Robben und Milchkühen

Die Analyse der Konzentration des IGF-I aus den Serumproben der Robben und der Milchkühe erfolgte mit einem kommerziellen Immunradiometrischen Assay (IRMA IGF-I; Immunotech, Beckman Coulter, Kalifornien, USA). Der Assay wurde anhand der Herstellerangaben ausgeführt.

Zu Beginn der Untersuchung erfolgte zunächst ein Dissoziationsschritt um das zu analysierende IGF-I durch Proteinpräzipitation von den Bindungsproteinen zu trennen. Hierzu wurden 25 μ l der Serumprobe mit 500 μ l Dissoziationspuffer vermischt.

Für die weitere Analyse wurden die im Test enthaltenen Teströhrchen verwendet, welche mit monoklonalem Antikörper gegen zwei verschiedene Epitope des IGF-I beschichtet sind. Zu diesen Röhrchen wurden zuerst 300 μ l der 125 I-markierten IGF-I-Tracer-Lösung hinzugefügt. Nachfolgend wurden 50 μ l der Serumprobe, der Kontrolle oder des Standards ergänzt und dann eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) bei 350 rpm gründlich gemischt. Der überschüssige Tracer wurde nach der Inkubation durch dekantieren entfernt, das Teströhrchen nochmals ausgeklopft und anschließend zweimal gewaschen um den nicht-radioaktiv-markierten IGF-I-Anteil zu entfernen. Die Messung der Radioaktivität wurde mit dem Gamma-Counter (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) durchgeführt. Die detektierte Radioaktivität war dabei direkt proportional zu der Konzentration von IGF-I. Eine Berechnung der Konzentration erfolgte mit Hilfe der Standardkurve.

Der untere Messbereich lag bei 10 ng/ml. Zur Ermittlung des Intra-assay VK bei den Robben wurde zwanzigfach dieselbe Probe gemessen und der VK berechnet, welcher bei 6,9 % lag. Der Intra-assay VK der Messung beim Rind lag bei 5,1 % und der Inter-assay VK bei 9,3 %.

3.4.2.5. Progesteron-Konzentration im Serum der Milchkühe

Zur Feststellung des Zyklusstandes erfolgte die Bestimmung von Progesteron aus den Serumproben der Kühe mit Hilfe des automatisierten, kompetitiven Chemilumineszenz Immunoassays (LKPG1, Immulite™ 1000 System, Siemens Diagnostics, USA).

Die Serumprobe wurde hierfür in ein Testtube gegeben und dieses in das Probenkarussell eingesetzt. Nachfolgend pipettierte der Automat selbständig die benötigte Analysemenge von 25 µl des Serums in das Testtube. Eine Kugel in diesem Testtube war mit monoklonalem Maus-Antikörper gegen Progesteron beschichtet. Die nachfolgende Inkubation (30 Minuten bei Raumtemperatur), sowie die Waschvorgänge erfolgten automatisiert. In einem weiteren Schritt wurde ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter, zweiter polyklonaler Kaninchen-Antikörper hinzu pipettiert. Dieser zweite Antikörper war spezifisch für Progesteron. Weiterhin wurde ein für die alkalische Phosphatase spezifisches Substrat, bestehend aus Adamantyl 1,2-Dioxetane-Arylphosphat, in das Teströhrchen gegeben. Die durch die Phosphatase katalysierte Dephosphorylierung des Substrats führte zu einem instabilen Reaktionsprodukt (Adamantylidioxetan). Nachfolgend wurde die durch diese Instabilität entstandene Lichtemission gemessen. Die Konzentration von Progesteron im Serum war hierbei proportional zu der detektierten Lichtemission. Die Berechnung erfolgte mittels einer hinterlegten Standardkurve. Die analytische Sensitivität dieses Immunoassays lag bei 0,2 ng/ml mit einem unteren Messbereich von > 0,3 ng/ml. Der festgestellten Inter-Assay VK und Intra-Assay VK lagen zwischen 5,8-16 % beziehungsweise 6,3-16 %.

3.5. Statistische Auswertung

Alle Daten wurden zu Beginn in einer Excel-Tabelle (© 2010 Microsoft, Redmond, Washington, USA) sortiert und aufbereitet.

Die statistische Berechnung der erhaltenen Daten aus der I. Studie bei den Robben wurden mit den Open-Source Paketen des R-Projektes für statistische elektronische Datenverarbeitung (R Core Team 2013, R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich) durchgeführt.

Für die II. und III. Studie erfolgte die statistische Auswertung mit S.A.S[®] 9.2. (S.A.S 2010, S.A.S Institute Incorporated, Cary, North Carolina, USA).

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte (mean) \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die Ergebnisse mit einem *P*-Wert von < 0.05 wurden als statistisch signifikant eingestuft. *P*-Werte zwischen > 0.05 und < 0.1 wurden als statistische Tendenzen angesehen.

3.5.1. Evaluierung verschiedener Matrices zur Beurteilung des Stressstatus bei Seehunden (I. Studie)

Die erhobenen Daten wurden zunächst mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Ein ungepaarter Student's t-Test wurde anschließend angewendet um Unterschiede zwischen den untersuchten männlichen und weiblichen Seehunden festzustellen. Die Analyse der Stärke des linearen Zusammenhangs der Cortisolkonzentrationen in den drei Untersuchungsmaterialien Tränenflüssigkeit, Speichel und Serum erfolgte mittels Pearson-Korrelation. Zur grafischen Darstellung dieser Korrelationen wurden Streudiagramme in Excel (© 2010 Microsoft, Redmont, Washington, USA) angefertigt.

3.5.2. Beurteilung des Steroidhormons Dehydroepiandrosteron bei verschiedenen Robbenarten (II. Studie)

3.5.2.1. Statistische Auswertung der Blutparameter

Zuerst erfolgte die Prüfung der Daten auf das Vorliegen einer Normalverteilung mit Hilfe der Shapiro-Wilk-Tests innerhalb der drei Untersuchungsgruppen ($n < 90$; Proc Univariate normal plot; S.A.S. 2010). In nicht normalverteilten Daten (DHEA und Cortisol/DHEA-Quotient) erfolgte die statistische Auswertung anhand des nicht parametrischen Kruskal-Wallis-Tests (Proc npar1way; S.A.S., 2010). Die nicht normalverteilten IGF-I-Daten wurden mittels exponentieller 1/3-Transformation mathematisch umgewandelt, um eine Normalverteilung zu erreichen. Zur Feststellung der statistischen Unterschiede der Variablen wurde ein Student's t-Test und eine parametrische Varianzanalyse (ANOVA; Proc ttest; Proc GLM and Pdiff; S.A.S. 2010) durchgeführt.

3.5.2.1.1. Belastungsindex

Basierend auf den Ergebnissen der statistischen Auswertung wurde ein Belastungsindex erstellt. Hierzu wurden folgende Parameter in Beziehung zueinander gesetzt:

$$\frac{\text{Ernährungszustand x Cortisol}}{\text{DHEA x IGF-I}}$$

Das erhaltene Ergebnis (X) wurde anschließend wie folgt korrigiert:

$$\frac{(\text{X-Minimalwert})}{(\text{Maximalwert-Minimalwert})} \times 100$$

3.5.2.2. Statistische Auswertung der Cortisolkonzentrationen im Speichel

Für die Analyse der normalverteilten Daten aus der vergleichenden Speichelcortisolmessung bei den habituierten Robben und den gesunden Wildtieren wurde ein Student's t-Test verwendet. Die nicht-normalverteilten Cortisolkonzentrationen in den Speichelproben der habituierten Seehunde vor und nach der Fütterung wurden mit dem Wilcoxon-signed-rank Test ausgewertet.

3.5.3. Bestimmung der Dehydroepiandrosteron-Konzentration von gesunden und an einer Metritis erkrankten Milchkühen postpartum (III. Studie)

Alle Ergebnisse wurden zunächst mit Hilfe eines Shapiro-Wilk Tests auf das Vorliegen einer Gauß'schen Normalverteilung innerhalb der drei Gruppen geprüft. In nicht-parametrischen Daten erfolgte anschließend ein Kruskal-Wallis Test (Proc. npar1way; S.A.S. 2010). Des Weiteren wurde eine parametrische Varianzanalyse (ANOVA, Proc GLM and Pdiff; S.A.S. 2010) zur Feststellung der statistischen Differenzen zwischen den Variablen durchgeführt. Zur Analyse des Zusammenhangs zwischen den gemessenen Parametern wurde eine Rangkorrelation nach Spearman (Proc. corr. spearman; S.A.S. 2010) angewendet.

Die grafische Darstellung der Unterschiede der Leukozytenzahlen und DHEA-Konzentrationen zwischen den drei Untersuchungsgruppen erfolgte mit Hilfe von Box-Whisker-Plots. Für die Erstellung in Excel (© 2010 Microsoft, Redmont, Washington, USA) wurde das 1. und 3. Quartil sowie der Median verwendet. Die Minimal- und Maximalwerte wurden als über die Box hinausziehende „Whisker“ dargestellt.

3.5.3.1. Belastungsindex

Im Anschluss an die statistische Auswertung der Blutparameter der gesunden und an einer Metritis erkrankten Milchkühe erfolgte die Berechnung eines Belastungsindex wie im Kapitel 3.5.2.1.1. beschrieben. Hierbei wurde der BCS als quantitative Bezugsgröße für den Ernährungszustand verwendet.

4. I. Studie

**Is lachrymal fluid a potential method for cortisol measurement in
wild harbor seals?: A pilot study**

Veröffentlicht im „International Journal of Veterinary Medicine: Research & Reports“:

N.H. Gundlach, M. Schmicke (Piechotta), U. Siebert (2014):

Is lachrymal fluid a potential method for cortisol measurement in wild harbor seals?: A pilot study

International Journal of Veterinary Medicine: Research & Reports, Vol. 2014 (2014),
Article ID 967043, doi: 10.5171/2014.967043

5. II. Studie

Origin of stress in pinnipeds – is it acute or chronic? Potential of dehydroepiandrosterone and cortisol/DHEA-ratio as markers for chronic stress

NH Gundlach^{1,2}, M Schmicke (Piechotta)², E Ludes-Wehrmeister¹, SA Ulrich¹, MA Gil³, U Siebert¹

¹Institute for Terrestrial and Aquatic Wildlife Research, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Werftstrasse 6, 25761 Buesum, Germany

²Clinic for Cattle, Endocrinology Laboratory, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover, Germany

³Department of Animal Biology, Faculty of Veterinary Science, University of Zulia, Maracaibo, Zulia 44011, Venezuela

Correspondence should be addressed to: Prof. Prof. h. c. Dr. Ursula Siebert;
ursula.siebert@tiho-hannover.de

5.1. Abstract

The cortisol concentration is known to reflect the immediate level of the stress response. But measuring the cortisol concentration only at a certain point in time fails to provide sufficient information about the previous duration of a potential stress exposure. Especially in wildlife species handling already is an acute stressor and therefore the validity of a single cortisol measurement is restricted. However, reliable indicators are missing that reflect a potential chronicity of a stressor in pinnipeds. The adrenal-derived steroidhormone dehydroepiandrosterone (DHEA) has been promoted as biomarker for the assessment of the stress status in human medicine. So far DHEA as well as the cortisol/DHEA-ratio (C/D-ratio) have not been applied to marine mammal research. Therefore, DHEA, the sulfated precursor form DHEAS and the C/D-ratio were determined in serum of different seals. One group consisted of harbor and gray seals living under human care and were habituated to human handling. The other two groups included healthy and diseased free-ranging harbor seals. Blood samples were taken from eight habituated seals (five male, three female), 16 wild and healthy seals (13 males, three females) as well as from nine free-ranging seals (four males, five females) who were suffering from a serious disease. In addition, samples of saliva were taken from *habituated_zoo* and *wild_healthy* seals in order to re-evaluate earlier findings. In the present study, no difference of the cortisol level in serum could be detected regarding free-ranging healthy seals and *wild_diseased* seals. On the contrary, *wild_diseased* seals showed the lowest DHEA concentration compared to the two other groups. Furthermore, *wild_diseased* seals also revealed the highest C/D-ratio compared to the *wild_healthy* (2074.71 ± 351.41 vs. 913.60 ± 224.02 , $P < 0.05$) and *habituated_zoo* group (137.71 ± 46.19 , $P < 0.001$). Thus, DHEA and the ratio of cortisol and DHEA could present a valuable tool for the assessment of stress related effects in harbor and gray seals. Additionally, they may also display the functionality of the hypothalamic-pituitary-adrenal-axis.

5.2 Introduction

In the field of marine mammal conservation biology, the assessment of anthropogenic impacts and their effects on the abundance, habitat use and health of marine mammals represents one of the main tasks. Thereby especially the stable population sizes of harbor seals and increasing numbers of gray seals counted in the area of the Wadden Sea (Galatius et al. 2014, Brasseur et al. 2014) may hold a higher rate of interactions. Anthropogenic impacts may, for example, result in an increase of the activation of the stress system which may adversely affect the health status. So far the evaluation of such an influence on the stress system is based mainly on the determination of the adrenal hormone cortisol. However, several studies demonstrated that the cortisol level is easily influenced by the sampling situation especially in non-habituated, free-ranging wildlife animals (Sheriff et al. 2011). Besides that, a single, non-repeatable blood sample for cortisol determination in wildlife species only represents a “snapshot” of the condition at sampling. Hence, no specific statement can be made about a potential long-term exposure to a stressor. Furthermore, the determination of cortisol only displays one part of the stress response since the stress system also influences and interacts with the nervous and immune system (Haddad et al. 2002). It is well known that especially cortisol may induce diverse alterations of the immune system. A persistent or frequent occurring activation of the stress system can cause a suppression of the immune response. This may even result in an incline of the susceptibility to various diseases. Such a phenomenon is partly based on a shift from “adaptation reactions”, as part of the stress response, towards a “state of exhaustion” of the regulatory mechanisms (Koolhaas et al. 2011). In order to enable an early detection of these changes, reliable parameters are necessary in order to indicate the interaction between the stress system and the potential alterations on the immune status. In this context the steroidhormone dehydroepiandrosterone (DHEA) and its precursor dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) have been evaluated in human medicine studies as potential parameters to evaluate chronic stress exposure. These prohormones of androgens and estrogens are mainly produced in the adrenal cortex. Therefore, both hormones are generally subjected to the same regulatory mechanisms as cortisol (Odell and Parker 1984). However, especially DHEA displays immunomodulatory as well as antigluccorticoid functions (Kalimi et al. 1994, Hazeldine et al. 2010). These antagonistic effects on cortisol are reported to cause a decrease of its impact, for example, during a stress response (Parker and Baxter 1985). So it is described that DHEA reduces the cortisol production by inhibiting the cortisol dehydrogenases (Thieringer et al. 2001, Apostolova et al. 2005). It has also been observed that DHEA competes with the glucocorticoid-receptor, via its metabolite

androgen. This can result in a downregulation of the glucocorticoid gene expression (Rundlett and Miesfeld 1995).

On the contrary, cortisol also seems to influence the DHEA concentrations. Recently, researchers of human medicine have discovered evidence that a hyperresponsiveness of the hypothalamic–pituitary–adrenal-(HPA)-axis may lead to decreased DHEA levels (Guilliams and Edwards 2010). Such interplay may occur during a chronic intermittent stress response (Ladewig 2000). DHEA concentrations and the cortisol/DHEA ratio (C/D-ratio) may therefore present reliable tools for the assessment of the functionality of the HPA-axis.

In the present study three groups were investigated. These groups consisted of seals living under the care of humans and free-ranging seals. The latter were potentially affected by anthropogenic stressors either displaying no obvious signs of disease or suffering from serious health problems. The aim was to compare DHEA and the C/D-ratio between these different groups and to evaluate these parameters as reliable indicators of a chronic activation of the stress system in pinnipeds.

5.3. Material and methods

5.3.1. Criteria for selection and definition of groups

In this study, various free-ranging pinnipeds from the German Wadden Sea or living in human custody were investigated. Three study groups were defined as follows:

The first group (*habituated_zoo*) consisted of harbor seals (*Phoca vitulina vitulina*) and gray seals (*Halichoerus grypus*) which are habituated to human handling and are living under human care.

Blood sampling was conducted of five gray seals (two male, three female) from the Allwetterzoo in Muenster, Germany and three male harbor seals of the Marine Science Center of the Institute for Biosciences, Sensory and Cognitive Ecology, University Rostock, Germany. Furthermore, saliva samples could be collected from three male harbor seals at the Zoo am Meer in Bremerhaven, Germany. In Muenster and Bremerhaven the harbor and gray seals are housed in an outdoor area with different sized water pools and an indoor dry area. The harbor seals at the Marine Science Center live in an enclosed area of the Baltic Sea (30 x 60 m, 2-6 m depth) next to the sailing marina in Rostock-Warnemuende, Germany.

The training of all seals is based on the method of positive operant conditioning. Due to positive reinforcement blood and saliva sampling are a part of the medical training routine on voluntary basis.

The second study group (*wild_healthy*) was made up of free-ranging, healthy harbor seals (n=16; 13 males, three females). These animals were captured and examined during the semi-annual health monitoring program in April 2013. The investigations were carried out by the Institute for Terrestrial and Aquatic Wildlife Research (ITAW) of the University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation on behalf of the Ministry of Energy, Agriculture, the Environment and Rural Areas Schleswig-Holstein, Germany (medical monitoring permit number for animal experiments/sampling V312-72241.121-19 (70-6/07)). The required procedures are described by Hasselmeier et al. (2008).

The third group (*wild_diseased*) included free-ranging, diseased harbor seals (n=9, four males, five females). These animals were classified as ill and not capable of surviving. Therefore they were killed by the commissioned seal ranger because of animal welfare reasons. Blood sampling was performed immediately *postmortem*. Furthermore, necropsy was conducted of the carcasses of these animals as part of the health monitoring at the ITAW.

5.3.2. General data

In habituated seals age was recorded in years. Concerning the wild seals they were assigned to the following age classes in accordance with Hasselmeier et al. (2008):

1. pups: seals born and deceased in the same year (harbor seals: ~0-6 months)
2. yearlings: seals deceased the year after birth (harbor seals: ~7-18 months)
3. (sub) adults: seals older than yearlings (harbor seals: > 18 months)

Furthermore, gender of each seal was documented and the seals were assigned to three nutritional conditions: poor, moderate or good. These categories were based on the *postmortem* classification of the body weight, blubber thickness and state of the musculature according to Siebert et al. (2007). This classification was also applied for living animals.

5.3.3. Blood sampling

Blood sampling of the eight seals which were accustomed to human handling (*habituated_zoo*) was part of the voluntary medical training routine in Muenster and Rostock. For this purpose, the seals got out of the water on command onto a platform. The seals turned into the ventral or dorsal position according to the trainer's hand signal in order to be manipulated at the caudal flippers. Then blood sampling was performed using a disposable 10 mL syringe (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) with a mounted 20 gauge

needle (0.90 x 40 mm, Sterican[®], B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) from the veins of the *plexus plantaris*, plantar of the calcaneus, as described by Wehrmeister (2014). The obtained blood was immediately transferred in a 4.9 mL serum tube as well as a 2.6 mL EDTA-tube (Monovette[®], Sarstedt, Nuembrecht, Germany).

Regarding the *wild_healthy* group, blood sampling was performed from *extradural intravertebral vein* in restrained seals according to Lynch and Bodley (2007) and Hasselmeier et al. (2008).

For obtaining blood from the *wild_diseased* group, either the *extradural intravertebral vein* was punctured (Hasselmeier et al. 2008) or blood was gained directly *postmortem* from intracardial puncture using a disposable 20 mL syringe (Soft-Ject[®], Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Germany) mounted with a needle (1,50 x 100 mm, Supra, Ehrhardt Medizinprodukte GmbH, Geislingen, Germany).

Concerning all three groups, the EDTA-tubes were used for immediate determination of blood counts. The serum tubes were centrifuged for 10 minutes at 3000 x g (Heraeus Multifuge 3SR, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA respectively EBA 20, Hettich Zentrifuge, Tuttlingen, Germany), the supernatant separated and stored at -20 °C until further processing.

5.3.4. Saliva sampling

Saliva could be sampled from all *habituated_zoo* phocids (n=11) in Munster, Rostock and Bremerhaven as well as from the *wild_healthy* harbor seals (n=16) during the health monitoring program in April 2013. Due to killing or illness no saliva samples could be collected from the *wild_diseased* harbor seals because of blood contamination of the oral cavity.

In the *habituated_zoo* group, saliva sampling was included in the routinely medical training. The trainers wore disposable gloves during the collection of saliva samples. Following a certain hand signal the seals opened the mouth and the trainers could insert the cotton swap of the Salivette[®] (Sarstedt AG & Co., Nuembrecht, Germany) in the buccal cavity. The seals shut the oral cavity again for about 30 seconds. Afterwards, the trainers gave a hand signal to open the oral cavity for re-collecting of the cotton swap using a forceps. The cotton swap was

directly transformed to the transport tube and stored at -20 °C until further analyses of cortisol were performed.

Regarding the three harbor seals at the zoo in Bremerhaven the described collection of saliva was performed twice, before and after feeding, in order to evaluate whether this might affect the analysis of cortisol.

Saliva samples from the *wild_healthy* harbor seals were collected in the course of examination during the health monitoring in April 2013. For this procedure the cotton swab (Salivette[®], Sarstedt AG & Co., Nuembrecht, Germany) was inserted in the buccal cavity by a forceps for about 30 seconds to collect saliva. Afterwards the swap was immediately put back into the tube of the Salivette[®] and kept cool on ice before being stored at -20 °C.

5.3.5. Laboratory Analysis

5.3.5.1. Determination of differential blood counts

Blood count was accomplished by using a commercial veterinarian analyzer with impedance measurement in accordance to Hasselmeier et al. (2008).

5.3.6. Endocrinological analyses

5.3.6.1. Cortisol in serum

The concentration of cortisol in serum was measured by using a chemiluminescence immunoassay (Immulite[™]1000 systems, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Germany) while following the manufacturer instructions. The analytical sensitivity was 2 ng/mL. There is an observed cross reactivity with prednisolone (49 %), methylprednisolone (21 %), corticosterone (8.6 %), prednisone (5.9 %) and fludrocortisone (0.2 %). The intra-assay coefficient of variation (CV) was 4.5 % and inter-assay CV was 8.8 %.

5.3.6.2. Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) in serum

A radioimmunoassay (RIA DHEA sulfate, Beckman Coulter, CA, USA) was used for the determination of DHEAS concentration in serum according to the manufacturer's instructions. There is only a low probability of cross reactivity against other steroids since the used antibody is highly specific for DHEAS. The lower measurement range was adjusted to 1

µg/100 mL. Intra-assay CV was determined by twentyfold repeated measurements of one seal serum sample and was 7.6 %.

5.3.6.4. Dehydroepiandrosterone (DHEA) in serum

DHEA-concentration was analysed by a radioimmunoassay (DHEA RIA kit, DSL8900 Beckman Coulter, CA, USA) along the standard operation manual. The minimum detection limit was 0.09 ng/mL. There is an observed cross reactivity of approximately 0.02 % with DHEAS and 0.045 % with prednisolone. For the determination of the intra-assay CV of 5.6 % one sample was measured twenty times consecutively.

5.3.6.5. Insulin-like growth factor I (IGF-I) in serum

The concentration of IGF-I in serum was analyzed using a commercial immunoradiometric assay (A15729, IGF-I IRMA; Immunotech, Beckman Coulter, CA, USA) in accordance with the instructions of the manufacturer. The lowest measurement range was 10 ng/mL. The intra-assay CV was determined by twentyfold repeated measurement of the same sample and displayed 6.9 %.

5.3.6.6. Cortisol in saliva

Cortisol was extracted from the saliva cotton swap by using an ether extraction as described in Gundlach et al. (2014).

Following the manufacture's instructions, the free and unbound form of cortisol in saliva was determined using a commercial cortisol ELISA (Cortisol free in Saliva ELISA DES6611; Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Germany). The intra-assay CV was 5.6 %. Analytic sensitivity was 1.4 ng/mL and the lowest measurement range was adjusted to 0.125 ng/mL. A cross reactivity of 9.69 % with prednisolone, 1.85 % with cortison and < 1 % with other steroid should be noted according to the manufacturer.

5.4. Statistical analysis

For statistical analyses SAS (version 9.2., SAS Inc., Cary, NC, USA, S.A.S. 2010) was used. The data were tested for normal distribution using the Shapiro-Wilk test ($n < 90$; Proc Univariate normal plot; S.A.S., 2010). In not normally distributed data (DHEA and

cortisol/DHEA-ratio) the statistical analyses were done using a non-parametric test as Kruskal-Wallis test (Proc npar1way; S.A.S., 2010). Not normally distributed data of IGF-I were mathematically transformed using the exponent 1/3 transformation $[(X)^{1/3}=(X)^{1/3}]$ in order to achieve normal distribution.

To detect statistical differences between variables, student's t-tests and parametric ANOVA were performed (ROC TTEST; Proc GLM and Pdiff; S.A.S., 2010). The data are presented as the mean±standard error (SE). For all procedures, the statistical significance was pre-established at $P < 0.05$. P-values between $P > 0.05$ and $P < 0.10$ were considered as statistical tendencies.

5.4.1. Stress index

Based on the statistical findings a stress index was provided by calculating the relationship between the nutritional status and cortisol- as well as DHEA- and IGF-I- concentrations of the three study groups:

$$\frac{\text{nutritional state} \times \text{cortisol}}{\text{DHEA} \times \text{IGF-I}}$$

Afterwards the results (X) were corrected by a formula index:

$$\frac{(X - \text{minimum values})}{(\text{maximum values} - \text{minimum values})} \times 100$$

5.5. Results

5.5.1. Animal data

In the *habituated_zoo* group the five male seals were 25 ± 3.3 years and the three females 21 ± 6.0 years old. Three harbor seals (two male, one female) in the *wild_healthy* group were classified as yearlings and 13 seals (11 male, two female) as (sub) adults. The *wild_diseased* group consisted of two yearlings (one male, one female) and seven pups (three males, four females).

The seals of the group *habituated_zoo* showed all a good nutritional condition. For the *wild_healthy* seals a moderate nutritional status could be detected in nine harbor seals (three yearlings, six (sub) adults) and a good status in seven seals (all (sub) adults). In the *wild_diseased* group only two pups and one yearling displayed a moderate nutritional status. The remaining six harbor seals (five pups, one yearling) showed a poor nutritional condition.

II. Studie

In the *wild_diseased* group six dissected harbor seals suffered from pneumonia of diverse etiology which was associated with a final bacteremia in five animals. One of these six seals also showed a hepatitis. One male seal revealed as the main cause of death an enteritis and hepatitis combined with a septicemia. Two female pups showed severe cachexia and died during perinatal period.

5.5.2. Laboratory Analyses

5.5.2.1. Blood cell counts

The determined blood cell counts did not differ between the three study groups and all values were within reference ranges (table 1).

Table 1: Blood cell count results of the three study groups *habituated_zoo*, *wild_healthy* and *wild_diseased* (mean±SEM), reference values from Dierauf and Gulland (2001)

Group	<i>habituated_zoo</i> (n=8)	<i>wild_healthy</i> (n=16)	<i>wild_diseased</i> (n=9)
leucocytes (4.8-14.25 x10 ⁹ /L)	6.79±0.93	10.06±0.35	7.22±1.00
erythrocytes (4.1-5.5 x10 ¹² /L)	3.65±0.07	4.84±0.08	4.52±0.30
thrombocytes (155-555 x10 ⁹ /L)	311.75±32.31	344.88±20.74	243.56±43.07
hematocrit (45-66 %)	45.73±0.86	56.30±0.76	48.51±2.52
haemoglobin (17.0-23.5 g/dL)	17.53±0.33	20.58±0.23	17.53±0.97

5.5.3. Endocrinological results

5.5.3.1. Cortisol concentrations

The lowest cortisol concentrations were measured in the *habituated_zoo* compared to the *wild_diseased* group ($P < 0.0001$). The values of the *wild_healthy* and *wild_diseased* seals were comparable ($P > 0.05$).

II. Studie

Table 2: Endocrinological results of the three study groups *habituated_zoo*, *wild_healthy* and *wild_diseased* (mean±SEM)

variable	<i>habituated_zoo</i> (n=8)	<i>wild_healthy</i> (n=16)	<i>wild_diseased</i> (n=9)
Cortisol (ng/mL)	31.88±5.88 ^b	204.50±13.75 ^a	256.09±39.64 ^{a****}
DHEAS (ng/mL)	21.65±2.73	25.38±1.82	19.45±2.81
DHEA (ng/mL)	0.51±0.15 ^{ab}	0.94 ±0.26 ^{a*}	0.17±0.05 ^b
Cortisol/DHEA	137.71±46.19 ^c	913.60±224.02 ^{b**}	2074.71±351.41 ^{a***}
IGF-I (ng/mL)	5.8±0.74 ^a (266.14±97.49)	6.33±0.24 ^{a**} (271.18±31.31)	4.01±0.4 ^b (78.77±19.59)
stress index	0.64±0.27 ^b	6.64±2.01 ^b	32.24±12.16 ^{a**}

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

5.5.3.2. Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) concentration

Concentrations of the DHEAS (table 2) were comparable between *habituated_zoo*, the *wild_healthy* and *wild_diseased* group.

5.5.3.3. Dehydroepiandrosterone (DHEA) concentration

The lowest DHEA-concentration could be detected in the *wild_diseased* group (table 2). The *wild_healthy* seals revealed considerable higher DHEA-concentrations compared to the *wild_diseased* group ($P < 0.05$).

5.5.3.4. Cortisol/DHEA – ratio

Wild_diseased harbor seals showed the highest C/D-ratio compared to the *habituated_zoo* and *wild_healthy* group ($P < 0.001$, table 2). The ratio of the *wild_healthy* group was higher than of the *habituated_zoo* seals ($P < 0.01$).

5.5.3.5. Insulin-like growth factor I concentration

The IGF-I concentrations in the *habituated_zoo* group were similar to the concentrations in the *wild_healthy* group (table 2). The IGF-I levels in the *wild_diseased* harbor seals were lower compared to the *wild_healthy* harbor seals ($P < 0.01$). Regarding the differences in gender, the male *wild_healthy* seals revealed about threefold higher IGF-I values as the *wild_diseased* males (301.99 ± 32.94 ng/mL vs. 98.22 ± 12.55 ng/mL, $P < 0.05$).

5.5.3.6. Salivary cortisol concentration

The *wild_healthy* seals displayed a cortisol concentration in saliva of 0.82 ± 0.14 ng/mL which was similar to the cortisol values in the *habituated_zoo* group of 1.46 ± 0.28 ng/mL. However, concentrations of salivary cortisol in the *habituated_zoo* harbor seals were higher compared to the result of the gray seals (1.87 ± 0.31 ng/mL vs. 0.39 ± 0.07 ng/mL, $P < 0.05$).

Regarding the cortisol concentrations in saliva the three seals in Bremerhaven displayed comparable results before (1.35 ± 0.17 ng/ml) and after (1.90 ± 0.32 ng/mL) fish feeding.

5.5.3.7. Stress index

The lowest stress index could be detected in the *habituated_zoo* group (table 2) which differed significantly from the highest values of the *wild_diseased* seals ($P < 0.01$) but not from the *wild_healthy* group.

5.6. Discussion

In domesticated animals several indicators have been tested under constant examination conditions to detect changes of the metabolisms and immune system during a stress response (Beerda et al. 1997, Moestl and Palme 2002). However, in marine mammals the numbers of approaches are limited. There are only a few baseline values available, which could be maintained under defined conditions and enable a sound assessment of the obtained data in free-ranging seals (Hasselmeier et al. 2008). This is particularly true for the determination of the stress hormone cortisol, which is easily influenced by handling and sampling (Cook et al. 2000, Mormède et al. 2007). To oppose this problem, seals living in human care, being accustomed to human handling and sampling procedure were investigated in the present study. The *habituated_zoo* harbor and gray seals revealed considerably lower cortisol values than the free-ranging seals ($P < 0.0001$) and a significant lower stress index compared to the *wild_diseased* group ($P < 0.01$). Lower cortisol concentrations could also be observed in a study in trained harbor porpoises (*Phocoena phocoena*). Here harbor porpoises being sampled on voluntary basis within the water pool showed decreased cortisol values compared to being restraint for blood sampling (Desportes et al. 2007). These findings as well as the results in the *habituated_zoo* seals of the current study may be explained by a subsequent decrease in the stress response of the HPA-axis due to habituation. In accordance with the definition of Thompson and Spencer (1966), this non-associative learning process occurs when repeated stressors, like sampling of blood, are no longer perceived as harmful and therefore become predictable. Based on this assumption the detected low cortisol concentrations of the *habituated_zoo* group could even be considered as being close to values during resting period, which may also be supported by the calculated low stress index.

Permanent changes in the immediate environment of marine mammals are often referred to as “environmental stressors” (Fair and Becker 2000, Wright et al. 2007). The sandbank, on which the investigated free-ranging harbor seals were captured, is located within the coastal water zone of the German North Sea. Within this area frequent anthropogenic activities take place like vessel traffic, fisheries, and recreation activities. This may be perceived as potential stressors by transient or resident seals. Such environmental stressors may result in alterations of behavior and metabolism, but also in changes of the immune and endocrine status. In some cases, these changes can also lead to an increased susceptibility to infections, for example parasite infestation or chronic diseases, due to a maladaptation of the organism (Koolhaas et al. 2011). In this context, possible differences of the cortisol, DHEAS and DHEA concentrations

were assessed between *wild_diseased* and *wild_healthy* harbor seals also in comparison to the results of the *habituated_zoo* group.

Here, no difference between the cortisol concentrations in *wild_diseased* and *wild_healthy* harbor seals could be determined. This presumably supports the aforementioned situation-related acute increase of cortisol due to capture and restraint in both groups. Such an increase was also described in a study of Champagne et al. (2012) investigating different handling procedures in free-ranging northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*). The authors could also detect a marked rise of the cortisol concentration which even sustained in ongoing restraint. Also Eskesen et al. (2009) concluded in a study investigating the stress response of harbor porpoises during satellite tagging that the observed high cortisol concentrations most probably represented the stress response due to capture rather than investigation and tagging procedures. The solely determination of cortisol in free-ranging seals and porpoises therefore does not seem to present a reliable marker for the distinction between an acute or chronic activation of the stress system.

In the present study, the inactive precursor form DHEAS did not reveal differences between the study groups. But slight numeric differences comparing all investigated gray and harbor seals could be detected which may also be due to the different species, age classes or seasonal variations. In general, DHEAS is described as the most abundant steroidhormone in humans (Longcope 1996), but lower values have also been found in mice and rats (van Weerden et al. 1992). However, the role of DHEAS in seals remains unclear, as to the best of the author's knowledge this is the first time this steroid hormone has been assessed in a pinniped species. Thus, further investigations with a higher sampling number are needed to clarify the conditions in pinnipeds.

The *wild_diseased* seals, though, showed the lowest DHEA concentration compared to the *wild_healthy* group ($P < 0.05$). This low DHEA value was combined with a higher cortisol level ($P < 0.0001$) and also a significant higher calculated stress index ($P < 0.01$) in comparison to the results of the *habituated_zoo* group. According to a study in humans these opposite trends of the cortisol and DHEA concentrations may indicate a chronic activation of the stress system leading to a hyperresponsiveness of the HPA-axis (Konduru 2012). The resulting consequences are a shift towards cortisol production causing a quantitative reduction of DHEA concentrations (Guilliams and Edwards 2010). The enhancement of the cortisol secretion might have also affected the balance between cortisol and DHEA, displayed by the highest C/D-ratio in the *wild_diseased* seals compared to the two other groups ($P < 0.001$). These findings may also support the assumption of an ongoing alteration of the stress

response reflecting a potential chronic dysregulation of the HPA-axis (Konduru 2012). Hence, these presumed stress-related changes in the *wild_diseased* seals may further have caused or exacerbated a maladaptation of the cellular immune response inducing a severe immunosuppression as it is described, for example, by Haddad et al. (2002). As a possible result, an exhaustion of the body's regulatory mechanisms may have occurred leading to the detected poor health status of these seals which could be noticed during the *postmortem* examinations (McEwen 1998, Koolhaas et al. 2011).

On the contrary, the highest DHEA values could be detected in the *wild_healthy* seals ($P < 0.05$). Such an increase has been described during an acute stress response or as an expression of the regulative function on the HPA-axis (Oberbeck et al. 1998, Maninger et al. 2010). Besides that, higher DHEA-levels were associated with an immunomodulatory enhancement of the cellular immune functions during inflammation in humans and rodents (Knoeferl et al. 2003). Moreover, the C/D-ratio in the *wild_healthy* seals differed significantly from the *habituated_zoo* and also *wild_diseased* group ($P < 0.05$). Since the C/D-ratio is described as a tool for the estimation of the functionality of the HPA-axis (Guilliams and Edwards 2010) and there were no signs of inflammation, it may be suspected that the C/D-ratio in the *wild_healthy* seals eventually displays an ongoing modification of the activity of the HPA-axis. These changes could, for example, be due to a subclinical long-term stress exposure as it is also described for a chronic intermittent stress response (Ladewig 2000).

As a conclusion, DHEA and the C/D-ratio seemed to demonstrate different activity levels of the HPA-axis between the investigated seal groups. They may therefore present promising and valuable tools for distinct assessment of the potential effects due to chronic stress system activation, for example possibly caused by anthropogenic interactions, in harbor and gray seals. Moreover, comparable results of the calculated stress index and C/D-ratio could be detected indicating similar patterns in each study group. Hence, the stress index may present an auxiliary device as it additionally reflects a potential impact of the nutritional status on the stress system activity.

However, further investigations are needed to reveal the involved regulatory mechanisms and effects of DHEAS and DHEA in the examined phocids.

Besides the assessment of potential indicators for the HPA-axis activity, it has been shown that changes of the stress response, in particular increased cortisol levels, may also negatively influence the function of the metabolic marker IGF-I (McCusker 1998, Dardevet et al. 1998). This hormone has already been described to be involved in the regulation of nutrition and

growth physiology in pinnipeds (Ortiz et al. 2003, Richmond et al. 2009, du Dot et al. 2009). So in the study of du Dot et al. (2009), a decrease of IGF-I concentration as well as an increase of cortisol during times of reduced food intake could be observed. The authors suggested that these changes are part of the decline of the anabolic impact of IGF-I on the metabolism in order to save energy reserves. Also in our study lower IGF-I concentrations in the *wild_diseased* harbor seals could be detected indicating a negative energy balance. This was even supported by the moderate to poor nutritional status of these animals. On the contrast, highest IGF-I values were shown in the *wild_healthy* seals compared to the *wild_diseased* group ($P < 0.01$). Besides the detected moderate to good nutritional condition of the *wild_healthy* seals this may suggest a positive energy balance. Therefore, as recently suggested in other pinniped species IGF-I seems to be a good parameter for the assessment of the metabolic status regarding the energy balance in the investigated harbor and gray seals.

Despite the search for indicators in blood, researchers especially in the wildlife sector have extended the assessment of stress in different sampling materials. As previously described in harbor seals (Gundlach et al. 2014) saliva present a promising matrix since there is normally enough sampling material available and trained examiners are able to quickly gain a salivary sample (Fell et al. 1985). Furthermore, a physiological time gap between changes of cortisol in serum and the free, unbound form in saliva has been recorded in humans (Kirschbaum and Hellhammer 1989) and also recently in livestock animals (Cook 2002, Hernandez et al. 2014). In pinnipeds this gap may help to measure situation independent salivary cortisol values. Comparing the results of the *wild_healthy* harbor seals and *habituated_zoo* harbor and gray seals no influence of the sampling procedure on the cortisol level could be detected. However, differences could be revealed between the *habituated_zoo* harbor and gray seals with lower values in the gray seal samples ($P < 0.05$). Slight changes between sampling procedures as well as individual variation may provide possible explanations (Stone et al. 2001). Also a species dependent difference may be assumed. Further clarification would require a serial measurement of saliva samples in single individual as well as a higher sample size.

As it is discussed in human medicine studies (Toda et al. 2004), saliva may contain food remains which can possibly influence the analyzed cortisol level. In the present study, no effect of the fish feeding could be shown on the measured cortisol concentration in the *habituated_zoo* harbor seals. So the unknown time point of the last food intake in free-ranging

seals does not seem to reduce the informative value of determined salivary cortisol levels for the assessment of the stress status in phocids.

Therefore, based on the current and earlier findings saliva sampling in free-ranging seals may present a situation independent alternative for the assessment of cortisol. Nevertheless, it must be recognized that in order to detect a possible chronic stress exposure also repeated salivary sampling is needed to display chronic functional alterations of the HPA-axis (Wuest et al. 2000).

5.7. Conclusion

It could be shown that the determination of cortisol in free-ranging seals is highly influenced by factors such as capture and handling. Moreover, assesment based on a single cortisol concentration failed to point out possible longterm alterations of the HPA-axis which potentially may be caused by a chronic stress exposure. In contrast to cortisol, DHEA and the cortisol/DHEA-ratio allowed a more distinct presentation of the activity of the HPA-axis in the investigated harbor and gray seals. Therefore, the simultaneous determination of cortisol and DHEA may represent a more reliable tool for the evaluation of potential anthropogenic impacts on the health status of free-ranging marine mammals. Furthermore, the metabolic marker IGF-I also seemed to be a sound indicator for the assessment of the nutritional status in different pinnipeds.

5.8. Acknowledgements

We especially like to thank the responsible staff members of the Marine Science Center Rostock, the Allwetterzoo in Muenster and the Zoo am Meer Bremerhaven as well as the seal rangers in Schleswig-Holstein and the helpers during the health monitoring and necropsies for their support. Furthermore, we thank Prof. Dr. Guido Dehnhardt and Dr. Frederike Hanke, Dr. Carsten Ludwig and Dr. Joachim Schoene for their support. We also want to thank Martina Baumgarten, Angela Jordan, Kornelia Wolff-Schmidt and Miriam Hilmann for the technical help.

6. III. Studie

DHEA and cortisol/DHEA-ratio in dairy cattle – evaluation as biomarkers for postpartum metritis

NH Gundlach^{1,2}, Y Gundelach⁴, M Feldmann⁴, MA Gil³, U Siebert², M Hoedemaker⁴,
M Schmicke (Piechotta)¹

¹Clinic for Cattle, Endocrinology Laboratory, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover, Germany

²Institute for Terrestrial and Aquatic Wildlife Research, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Werftstrasse 6, 25761 Buesum, Germany

³Department of Animal Biology, Faculty of Veterinary Science, University of Zulia, Maracaibo, Zulia 44011, Venezuela

⁴Clinic for Cattle, Production Medicine Unit, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover, Germany

Correspondence should be addressed to: JProf. Dr. Marion Schmicke (Piechotta);
marion.schmicke@tiho-hannover.de

6.1. Abstract

Whether chronic stressful events or immunological dysregulations cause an increase in the prevalence of inflammatory reproductive disease *postpartum* could not be unequivocally validated yet. This is due to the fact that reliable biomarkers for the detection of chronic stress in *postpartum* cows are missing. Herein dehydroepiandrosterone (DHEA), produced by the adrenal cortex, and its sulfated form (DHEAS) were previously described as antiglucocorticoid as well as immunoprotective signals. They can interact with the expression of inflammatory genes (e.g. proinflammatory cytokines) in circulating leukocytes but also serve as an indicator for chronic stress in human medicine. However, so far little is known about these hormones during inflammatory processes in *postpartum* dairy cows. Therefore DHEA, DHEAS and the cortisol/DHEA-ratio (C/D-ratio) were determined in cows with and without clinical metritis subcategorized by the blood leukocyte number. Blood from *coccygeal vein* of 37 pluriparous Holstein Friesian cows was sampled 8.8 ± 0.9 days (mean \pm SE) after calving. According to clinical signs of metritis and the number of leukocytes (L, normal range $5-10 \times 10^6/\mu\text{l}$), as an indicator for severity of inflammation, the cows were classified as healthy (L $H=5954.17 \pm 302.4/\mu\text{l}$), suffering from metritis with leukocyte number within range or metritis with leucopenia (L $M_{\text{range}}=7422.22 \pm 774.74/\mu\text{l}$ vs. $M_{\text{low}}=3950 \pm 284.31/\mu\text{l}$ $P < 0.01$). Cows with metritis showed higher DHEA concentrations compared to healthy cows. Notably, cows with metritis and leucopenia even displayed significantly higher DHEA concentrations compared to cows with metritis and a normal number of leukocytes (DHEA M_{low} 8.15 ± 3.09 vs. M_{range} $4.09 \pm 1.82 \text{ ng/mL}$, $P < 0.05$). Cows with metritis and leucopenia also had lower C/D-ratio compared to healthy cows. In conclusion, it remains questionable whether DHEA may be applied as a chronic stress marker in dairy cattle with inflammatory diseases. The detected high DHEA levels in cows with metritis and leucopenia of the present study are more likely to indicate potential and interesting immunomodulatory mechanisms of DHEA.

6.2. Introduction

The assessment of stress represents a recurring issue in animal welfare research. Especially the debate and definition of physiological versus pathological stress events is of interest in dairy cattle management since particularly prolonged perturbations may lead to development and progression of pathological alterations (McEwen and Wingfiel 2003). Up to 50 % of pluriparous dairy cows develop a *postpartum* production disease which may therefore be exacerbated by chronic stress (Mulligan and Doherty 2008, Sheldon et al 2009).

According to Kelton et al. (1998), the term production diseases includes metabolic (e.g. ketosis, hypocalcaemia, abomasal displacement) as well as inflammatory reproductive disorders (mastitis, endometritis and metritis). As underlying causes dysregulation of metabolic and other endocrine processes combined with an alteration of the immunological status are widely discussed (Ingvarsen 2006, Sheldon et al. 2009). Simultaneously, the physiological periparturient impact on the immune system is triggered by these endocrine, especially stress mediated, changes of the metabolic status. These changes may also result in an additional impact on the immunocompetence (Ingvarsen et al. 2003).

Numerous studies have confirmed the variety and complexity of potential chronic stressors during the production period such as inadequate nutrient intake (Grummer 1995), immunosuppression and pathogen load (Ingvarsen et al. 2003) as well as environmental changes (Drackely 1999, Houe et al. 2000). Therefore, it is necessary to pay attention to the evaluation of different biomarkers for disease susceptibility *postpartum*. Especially insulin-like growth factor–I (IGF-I) was previously addressed as a “coupler” between metabolism, energy balance, reproduction (Konigsson et al. 2008) as well as inflammation (Huszenicza et al. 2004, Kulcsár et al. 2005).

So far previous investigations of the stress axis in this context have mainly focused on single determination of the classical hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) stress hormone cortisol. But a rise of cortisol may also be detected due to restraint and handling (Cook et al. 2000, Mormède et al. 2007) as well as physiologically during parturition (Patel et al. 1996, Kindahl et al. 2004). This also restricts the significance and meaning of cortisol as a solely stress biomarker (Wright et al. 2007). Therefore, in human medicine the steroid hormone dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated form (DHEAS), both mainly secreted by the cortex of the adrenal glands, as well as the determination of the cortisol/DHEA (C/D)–ratio is proposed for independent stress assessment. On the one hand, DHEA and DHEAS act as prohormones for sexual steroid hormones but also show antiglucocorticoid qualities

presumably as indirect competitive inhibitor of cortisol (Hazeldine et al. 2010). On the other hand, DHEA also seems to have antiinflammatory but immunoprotective attributes as well as immunomodulatory effects on the humoral and cellular immune response, interacting with several cytokines, for example inhibiting interleukine-6 (Straub et al. 1998, Gordon et al. 2001). There has also been evidence that DHEA maintains the balance of the T-helper-cell-type 1 (TH1) to T-helper-cell-type 2 (TH2) by modulating an immunological TH1/TH2 shift (Kidd 2003, Hazeldine et al. 2010). In a study of Almeida et al. (2008) lame cows with inflammatory foot lesions displayed a decrease in serum DHEA concentration combined with an increase of serum C/D-ratio. This might suggest a possible chronic effect on the activity of the HPA-axis.

Thus, the aim of the present study is to determine DHEA, DHEAS and the cortisol/DHEA (C/D)-ratio as well as the metabolic coupler IGF-I in cows suffering from metritis and healthy counterparts.

6.3. Material and methods

6.3.1. Criteria for selection and clinical examination

The present study was approved by the German legislation on animal welfare (Lower Saxony State Office for Consumer Protection and Food Safety, permit number 33.4-42502-05-14A420).

Pluriparous Holstein-Friesian cows ($n=37$) < 21 days *postpartum* were clinically examined as part of the veterinary herd health care program by veterinarians of the Clinic for Cattle of the University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation at a dairy farm in Lower Saxony, Germany. The cows were held in a cubicle housing system fitted with a slatted floor. All lactating cows were fed a total mixed ration (48.4 % of grass silage and 27.7 % corn silage) blended with barley straw (10.4 %) combined with portioned concentrate (13.6 %: molasses pulp, rye, rape). They also had free access to water.

The clinical examination was performed in the morning and included the determination of body condition score (BCS; Edmonson et al 1989, Mansfeld et al 2000), rectal body temperature and gynaecological examination of uterus and ovaries with evaluation of uterine discharge.

Cows suffering from metritis (M) displayed an enlarged uterus and additional aquaeus, reddish-brown, malodorous uterine discharge to a varying degree in accordance with the definition of metritis grade 1 by Sheldon et al. (2009).

In addition to the results of the clinical and gynecological examination, the cows were subcategorized according to the results of leukocyte count as either healthy (H, n=24) or suffering from metritis with normal number of leukocytes (M_{range} , $5-10 \times 10^6/\mu\text{l}$, n=9) or with leucopenia (M_{low} , $< 5 \times 10^6/\mu\text{l}$, n=4).

6.3.2. Blood sampling

Blood samples were collected into 9 mL serum and EDTA- tubes (S-Monovette[®], Sarstedt, Nuembrecht, Germany) from the coccygeal vein. All samples were kept no longer than two hours at room temperature and centrifuged immediately afterwards.

Despite of the EDTA-blood for blood cell counts, the remaining tubes were centrifuged for 10 minutes with $1500 \times g$ (EBA 20, Hettich Centrifuges, Tuttingen, Germany) at room temperature. After centrifugation serum for endocrinological diagnostics were transferred to 2 mL Eppendorf tubes (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) and stored at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ until analysis.

6.3.3. Laboratory Analysis

6.3.3.1. Blood cell counts

Leukocyte counts were determined using an electronic cell counter with impedance measurement (Celltac, Nihon Kohden, Bad Homburg, Germany) validated for bovine blood in the clinical chemistry laboratory of the Clinic for Cattle of the University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Germany.

6.3.4. Endocrinological analyses

6.3.4.1. Cortisol

Analysis of cortisol in serum was performed according to the instructions of the manufacturer by using a chemiluminescence immunoassay (ImmuliteTM1000 systems, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Germany).

The analytical sensitivity was 2 ng/mL . The intra-assay coefficient of variation (CV) was 4.5 % and inter-assay imprecision was 8.8 %. There is an observed cross reactivity of approximately 49 % with prednisolone, 21 % with methylprednisolone, 8.6 % with corticosterone, 5.9 % with prednisone and 0.2 % with fludrocortisone.

6.3.4.2. Dehydroepiandrosteron-sulfate (DHEAS)

Determination of DHEAS in serum was performed by a radioimmunoassay (RIA DHEA sulfate, Beckman Coulter, California, USA) according to the manufacturer's instructions. As the used antibody is highly specific for DHEAS there is only a low probability of cross reactivity against other steroids (for example androstenedione, Δ 4-androstenedione, and cortisol). The lower measurement range was adjusted to 1 μ g/100 mL. Intra-assay CV was 7.4 %. The inter-assay CV recorded a figure of 10.6 %.

6.3.4.3. Dehydroepiandrosteron (DHEA)

DHEA was determined by using a radioimmunoassay (DHEA RIA kit DSL8900, Beckman Coulter, California, USA) along the standard operation manual. The minimum detection limit was 0.3 ng/mL. There is an observed cross reactivity according to the manufacturer of approximately 0.02 % with DHEAS and 0.045 % with prednisolon. The intra-assay CV was 5.4 %.

6.3.4.5. Insulin-like growth factor I

Total serum IGF-I-concentrations were determined applying a commercial radioimmunoassay (A15729, IGF-I IRMA; Immunotech, Beckman Coulter, California, USA) as previously validated for bovine plasma and described by Piechotta et al. (2014). This assay is based on a "sandwich" method using mouse monoclonal antibodies against two epitopes of IGF-I as detection antibodies. Lowest measuring range was 30 ng/mL and inter- as well as intra-assay CVs were 5.1 % and 9.3 %, respectively.

6.3.4.6. Progesterone

For the assessment of the state of oestrus cycle, concentrations of progesterone were determined by using an automated, competitive chemiluniscence immunoassay (LKPG1, Immulite™1000 System, Siemens Diagnostics, Eschborn, Germany) based on a sandwich-ELISA method. Intra and inter assay CV varied within the range of 6.3-16 % respectively 5.8-16 %. Analytic sensitivity was 0.2 ng/mL with a lower measurement range of 0.3 ng/mL.

6.4. Statistical analysis

For statistical analysis SAS (version 9.2., SAS Inc., Cary, NC, USA, S.A.S. 2010) was used. The data was tested for normal distribution using the Shapiro-Wilk test ($n < 90$; Proc Univariate normal plot; S.A.S., 2010). In not normally distributed data the statistical analysis was done using a non-parametric test as Kruskal-Wallis test (Proc npar1way; S.A.S., 2010). To detect statistical differences between variables, a parametric ANOVA was performed (Proc GLM and Pdiff; S.A.S., 2010). The data was presented as the mean \pm standard error (SE). The relationships between and within parameters were evaluated using the Spearman correlation (Proc corr spearman; S.A.S., 2010). For all procedures, the statistical significance was set at $P < 0.05$. The range of P-values between $P > 0.05$ and $P < 0.10$ were considered as statistical tendencies.

6.4.1. Stress index

Based on the statistical findings a stress index was provided by calculating the relationship between the product of body condition score (BCS) and cortisol values as well as the product of DHEA- and IGF-I-concentrations of the three study groups:

$$\frac{\text{BCS x Cortisol}}{\text{DHEA x IGF-I}}$$

Afterwards the results (X) were corrected by a formula index:

$$\frac{\text{(X-minimum values)}}{\text{(maximum values- minimum values)}} \times 100$$

6.5. Results

6.5.1. Clinical examination

The healthy cows were about 8.5 ± 1.1 (mean \pm SE) days *postpartum*, M_{range} cows were 10.0 ± 1.9 and M_{low} cows 8.3 ± 2.8 days *postpartum* ($P > 0.05$). The number of days *postpartum* showed no significant effect on the detected number of leukocytes ($P > 0.05$, table 3). The BCS in the M_{range} cows was 3.56 ± 0.10 and in the M_{low} 3.25 ± 0.14 . The control group displayed a BCS of 3.56 ± 0.11 . The body temperature was 38.68 ± 0.10 °C in healthy and 38.70 ± 0.14 °C in the M_{range} and 38.80 ± 0.06 °C in the M_{low} group ($P > 0.05$).

6.5.2. Laboratory Analysis

6.5.2.1. Blood cell counts

As shown in figure 3, healthy cows displayed $5954.2 \pm 302.4/\mu\text{l}$ white blood cells (WBC). Cows of the M_{range} group had a median WBC number of $7422.22 \pm 774.74/\mu\text{l}$ which was higher as in the M_{low} group ($P < 0.01$). Among metritis group four cows displayed a leucopenia (M_{low} $3950 \pm 284.31/\mu\text{l}$).

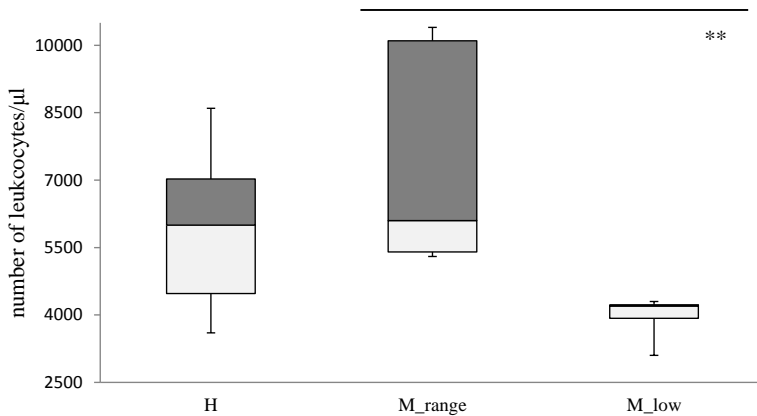


Figure 1: Number of leukocytes/ μl of the three study groups healthy (H), metritis with normal leukocytes counts (M_{range}) and metritis with leucopenia (M_{low}); $**P < 0.01$.

6.5.3. Endocrinological results

6.5.3.1. Cortisol concentrations

Serum cortisol concentrations in healthy cows were comparable to the results of the M_{range} and M_{low} cows (table 3).

III. Studie

Table 3: Parameters of the three study groups

Variable	Healthy (n = 24)	M _{range} (n = 9)	M _{low} (n = 4)
BCS	3.56±0.11	3.56±0.10	3.25±0.14
temperature (°C)	38.68±0.10	38.70±0.14	38.80±0.06
Cortisol (ng/mL)	6.73±1.17	7.64±1.84	5.15±2.00
Cortisol/DHEA-ratio	5.19±1.86	6.99±2.99	0.99±0.48
DHEAS (ng/mL)	28.84±1.84	27.88±2.63	24.96±2.50
DHEA (ng/mL)	2.47±0.31 ^b	4.09±1.82 ^{ab}	8.15±3.09 ^{a*}
DHEA/DHEAS-ratio	0.09±0.12 ^{a*}	0.16±0.74 ^{ab}	0.33±0.12 ^b
IGF-I (ng/mL)	93.28±12.57	92.99±27.76	117.67±11.48
stress index	6.71±2.06 ^a	17.2±10.68 ^{a†}	0.61±0.34 ^b

M_{range}= metritis with normal leukocytes counts, M_{low}= metritis with leucopenia,

* $P < 0.05$, † statistical tendency of $P = 0.0678$

6.5.3.2. Cortisol /DHEA – ratio

Healthy cows had a similar C/D-ratio (table 3) compared to M_{range}. On the contrary, the results of the M_{low} cows were six times lower result than the ones of the M_{range} group. A significant positive correlation between the concentrations of cortisol ($r_s = 0.79$, $P < 0.0001$) and a negative correlation regarding DHEA ($r_s = -0.75$, $P < 0.0001$) could be determined by Spearman correlation (table 4).

Table 4: Spearman correlation of metabolic and stress parameters in healthy cows and cows with metritis

	days p.p.	BCS	temperature	leukocytes	IGF-I	Cortisol	DHEA	C/D- ratio
BCS	0.17							
temperature	0.08	0.03						
leukocytes	0.19	0.11	0.17					
IGF-I	-0.03	0.16	-0.12	0.06				
Cortisol	-0.32	-0.01	0.03	0.07	-0.10			
DHEA	0.02	-0.15	-0.21	-0.28	0.20	-0.25		
C/D-ratio	-0.21	0.12	0.09	0.15	-0.21	0.79***	-0.75***	
DHEAS	-0.27	0.05	0.24	0.30	0.12	-0.12	0.18	-0.23

Statistical significance: ***($P < 0.0001$)

6.5.3.3. Dehydroepiandrosterone - sulfate (DHEAS)

Concentrations of the sulfated form of DHEA could be compared between the healthy, M_{range} and M_{low} cows.

6.5.3.4. Dehydroepiandrosterone (DHEA)

The serum DHEA concentration was 2.47 ± 0.31 ng/mL in healthy cows (figure 4). The M_{low} cows showed a significant higher DHEA concentration level compared to the healthy group (8.15 ± 3.09 ng/mL vs. 2.47 ± 0.31 ng/mL, $P < 0.05$).

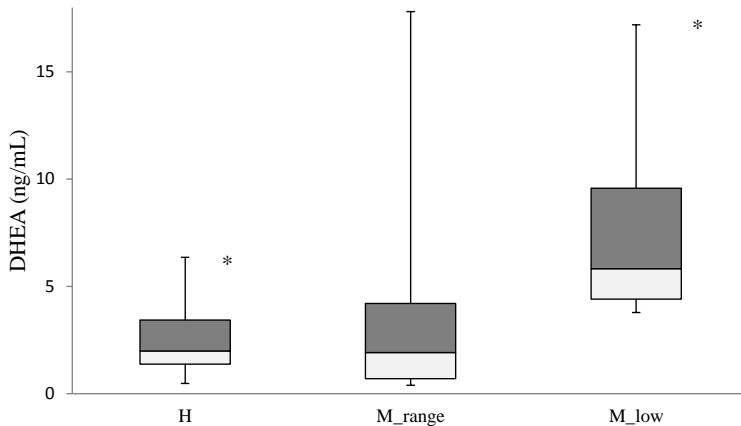


Figure 2: Concentrations of dehydroepiandrosterone (DHEA, ng/mL) in healthy (H) cows, and cows suffering from metritis with normal white blood cell counts (M_{range}) and metritis with leucopenia (M_{low}); * $P < 0.05$.

6.5.3.5. DHEA/DHEAS-ratio

The DHEA/DHEAS-ratio was lower in the group of healthy cows compared to the M_{low} cows ($P < 0.05$, table 3).

6.5.3.6. Insulin-like growth factor I

Serum IGF-I concentrations were comparable between the tested healthy, the M_{range} and M_{low} cows ($P > 0.05$).

6.5.3.7. Stress index

The calculated stress index of the healthy cows was lower than the one in the M_{range} group. The M_{range} cows showed a higher value compared to the M_{low} group ($P= 0.0678$).

6.5.3.7. Progesterone

Four cows of the healthy study group and one cow of each metritis group showed a concentration of progesterone (P4) >1 ng/mL, indicating a corpus luteum. The DHEA concentrations between cows with P4 $>/< 1$ ng/mL was comparable ($P> 0.05$).

6.6. Discussion

Whether inflammatory diseases *postpartum* are either caused by the impact of a chronic stress exposure or by a dysregulation of the immune system has been widely discussed in the literature (Sheldon et al. 2006, Ingvarsten 2006). DHEA and DHEAS are known as parameters for chronic stress assessment in human medicine (Butcher et al. 2005, Jeckel et al. 2010) but DHEA is also known to have several immunomodulatory functions (Daynes et al. 1990, Barkhausen et al. 2006). Based on the assumption that a chronic stress exposure causes a higher incidence of inflammatory reproduction diseases in the postpartal period (Ingvarsten 2006, Mulligan und Doherty 2008), differences of the cortisol, DHEAS and DHEA concentrations were analyzed comparing healthy cows and those suffering from an inflammatory reproductive disorder.

As the diseased cows of this study could all be assigned as suffering from metritis grade 1 (Sheldon et al. 2009) numbers of leukocytes were used for distinct subdivision and differentiation for the severity of inflammation and immune response. In the course of inflammation processes, a physiological rise of the number of white blood cells can be detected, as part of the innate immunity. In accordance to that the M_{range} cows displayed a numerically higher leukocyte number compared to healthy cows. However, depending on the severity of inflammation a decreased number of leukocytes (leucopenia) can also be noticed as demonstrated in the M_{low} cows. This reduction of the total leukocyte number might be due to an increased peripheral “consumption” and leukocyte extravasation or delayed supply in severe inflammation or intoxication (Guidry et al. 1976, Archana and Namasivayam 1999).

No difference between the three study groups were detected concerning the concentration of the classical stress hormone cortisol. Echternkamp (1984) could detect cortisol concentrations of about 5.7 ± 6.5 ng/mL in trained Herford cows. In a study of Hopster et al. (1999) Holstein Friesian and Holstein-Dutch Friesian crossbred dairy cows which were used to handling, showed mean cortisol values lower than 3 ng/mL. The authors interpreted these concentrations as being close to baseline values. As different laboratory methods were used in these two publications compared to the present study these results may only be used as an orientation. However, concerning the present study, it may be argued that the restraint as well as the potential alterations in the health status seemed insufficient to elicit a stress response both in the investigated healthy and diseased cows. Therefore, a solely determination of cortisol levels may not represent a reliable, sensitive marker to detect potential changes in the activity of the HPA-axis during inflammatory reproductive diseases.

In a study of Marinelli et al. (2007) DHEAS concentrations in cows are described to be significantly lower compared to DHEAS levels in humans and to values of the bioactive form DHEA in cattles. Interestingly, in the current study the investigated cows showed higher DHEAS concentrations in comparison to the DHEA values. This is also in accordance to the results of a human medicine study (Labrie et al. 1997). The disparity between the present findings and the results in the study of Marinelli et al. (2007) may be explained by differences in the investigated breed and also by varying states of the ovarian cycle or laboratory methods for DHEA measurement. In the study of Marinelli et al. (2007), multiparous Italian Friesian cows were investigated, being at least 55 days after parturition. In the present study, we examined multiparous Holstein Friesian dairy cattle 8.8 ± 0.9 days *postpartum*.

In human medicine, DHEAS is mainly considered as a reservoir and transfer molecule of the biologically active form DHEA, a precursor of the sexual hormones (Kalimi et al. 1994). Research in cattles, however, is still limited and the potential role of DHEAS in the bovine organism as well as possible differences depending on the species, age and reproduction cycle remain to be clarified.

In a study of Almeida et al. (2008) dairy cattle with inflammatory foot lesions showed a decrease of the DHEA concentrations ($P= 0.01$) and a higher cortisol/DHEA-ratio compared to a healthy control group. The authors speculated that these findings may be due to the assumed chronicity of the disease. Such chronic disease may reduce the immunoprotective qualities of DHEA, although the exact mechanisms remained unclear. On the contrary, in the

present study leucopenic cows with a metritis revealed the highest DHEA concentrations ($P < 0.05$) and the lowest cortisol/DHEA-values. Thus, these changes may rather indicate immunomodulatory and –protective functions of DHEA potentially caused by a reduced cellular immunity as displayed by the leucopenia (Kalimi et al. 1994, Angele et al. 1998, Hazeldine et al. 2010).

Tracy (2002) refers to the occurrence of an inflammation as a “local, protective response to microbial invasion or injury“. In the course of inflammation immune cells secrete proinflammatory mediators as part of the innate immunity. These mediators transmit information to the hypothalamus in terms of an immune-to-brain interaction (Watkins and Maier 1999, Jessop 1999). As a consequence, the activation of the hypothalamus leads to an promotion of antiinflammatory mechanisms including the release of cortisol and DHEA by the adrenal cortex (Besedovsky et al. 1991, Jessop 1999). Cortisol and DHEA are known to have antiinflammatory properties, whereas DHEA rather reveals immunoprotective than immunosuppressive functions as prescribed to cortisol (Blauer et al. 1991, Frantz 2005, Hazeldine et al. 2010). Hence, DHEA also seems to antagonize glucocorticoid effects during inflammation in animal models and humans, for example, by counteracting glucocorticoids-mediated suppression of several cytokines (Daynes et al. 1990, Danenberg et al. 1992, Straub et al. 1998). Moreover, Barkhausen et al. (2006) demonstrated in an in-vitro study an immunomodulatory effect of DHEA on the expression of several adhesion molecules regulating leukocyte extravasation. According to the authors, DHEA seemed to antagonize endotoxin induced changes of the leukocyte function. Therefore the increase of DHEA in M_{low} cows of the current study may also represent an immunomodulatory, counterregulatory effect of DHEA on the expression of the leukocyte adhesion molecules.

Additionally, Sanning (2010) concluded in a study about the influence of sepsis on cortisol and DHEA concentrations in humans that a rise in DHEA concentrations may possibly display a hormonal counterregulation in order to maintain a balance between the opposite effects of cortisol and DHEA. Thus, the apparent mismatch of the cortisol/DHEA-ratio in the M_{low} cows may also support the increase of the immunoprotective effect of DHEA. Furthermore, this ratio has also been described as a prognostic tool for a comparative assessment of disease progression and severity in different study groups in humans (Marx et al. 2003, Butcher et al. 2005). Possible applications in dairy cattle should therefore be investigated in further studies with follow-up design.

In addition, the DHEA/DHEAS-ratio displayed higher values in M_{low} cows compared to the healthy group ($P < 0.05$). The relationship between DHEA and DHEAS concentrations in terms of their ratio was also compared between healthy humans, those with recent hip fracture and those suffering from different degrees of sepsis (Sanning 2010). As a result septic patients displayed a five times higher DHEA/DHEAS-ratio in relation to the healthy control group. The authors argued that the responsible enzyme for conversion of DHEA in DHEAS, sulfontransferase (SULT2A1), is negatively influenced in septic condition, resulting in lower DHEAS values. This conclusion is supported by an experimental study of Kim et al. (2004) in which mice receiving lipopolysaccharide, in order to trigger an acute phase reaction, also showed reduced SULT2A1-activity. Consequently, higher DHEA/DHEAS-ratio of the leucopenic, diseased cows in the present study compared to the healthy group may also be due to a reduced production and transformation activity of the relevant sulfontransferase leading to higher DHEA in the serious ill cows.

IGF-I is described as a link between postpartal energy balance, metabolism and performance of reproduction (Konigsson et al. 2008). For postpartal metabolic alterations in dairy cattle research has already used IGF-I as indicator for negative energy balance peripartal (Butler et al. 2003). Such changes of the metabolism are presumed to increase disease susceptibility in *postpartum* dairy cattle (Ingvarsen 2003, Mulligan and Doherty 2008). However, in the present study IGF-I concentrations were comparable between postpartal healthy cows and cows suffering from metritis. This suggests a similar energy balance and metabolic status in the investigated cows *postpartum*. In addition, this assumption is also supported by comparable results of body condition scores. Hence, a continuous determination of IGF-I before, during and after parturition would be eventually more sensitive to detect early harbinger for changes of the energy balance.

6.7. Conclusion

Concentrations of DHEA differed significantly between healthy and diseased, leucopenic dairy cattle. Leucopenic cows suffering from metritis showed the highest levels of DHEA concentrations ($P < 0.05$). As a conclusion, higher DHEA concentration in the diseased leucopenic cows is more likely to indicate the activated immunoprotective and antiinflammatory quality supporting the drained cellular immune activity. The higher DHEA concentrations may therefore represent an antiinflammatory signal of the adrenal cortex. Consequently, the use of DHEA and DHEAS as a marker for chronic stress as well as the

full scope of potential activities in the bovine organism remains uncertain. However, assesment of DHEA and the cortisol/DHEA-ratio may display a valuable tool for comparative evaluation of the course and severity of inflammatory disease in dairy cattle.

6.8. Acknowledgements

The authors would like to thank the staff of the clinic for cattle especially from the Production Medicine Unit and Clinical and Endocrinology Laboratory as well as the owners and staff of the farm in Lower Saxony for their support. Special thanks go to Felix Graubner, Martina Baumgarten and Angela Jordan as well as Sandra Wilkening for help on the farm and in the laboratory.

7. Übergreifende Diskussion

Der Begriff „Stress“ im Sinne einer akuten Aktivierung des Stresssystems beschreibt eine physiologische Anpassung der Körperabläufe im Rahmen der Gefahrenabwehr (Chrousos und Gold 1992, Bartlett 1998, Romero und Butler 2007). Eine länger anhaltende, chronische Aktivierung des Stresssystems kann hingegen zu einer fehlgeleiteten Stressreaktion führen, die zudem in eine Erschöpfung der Adaptationsmechanismen münden kann (McEwen 1998, Romero und Butler 2007, McEwen 2008). Neben physiologischen können so auch pathologische Veränderungen im Rahmen einer Stressantwort auftreten, die aufgrund der Interaktionen insbesondere mit dem endokrinen und immunologischen System ebenfalls eine erhöhte Krankheitsanfälligkeit nach sich ziehen können. Als häufige Beispiele für eine chronische Stressbelastung in der Veterinärmedizin sind hierbei umweltbezogene wie auch anthropogene Stressoren zu nennen (Evans 1984, Fair und Becker 2000). Insbesondere eine mögliche Akkumulation anthropogener Umweltstressoren kann so beispielsweise bei freilebenden Seehunden zu einer chronischen Stresssystemaktivierung führen (Wright et al. 2009). Bei Milchkühen hingegen gelten haltungsbedingte Umweltstressoren besonders in der postpartalen Phase verbunden mit der steigenden metabolischen Leistung als potentielle Auslöser einer chronischen Stresssystembelastung und möglicherweise nachfolgenden pathologischen Veränderungen (Ingvarsen et al. 2003, Mulligan und Doherty 2008).

Bisherige Untersuchungen zur Ausprägung einer Stressantwort beruhen hauptsächlich auf der traditionellen Bestimmung der Konzentrationen der klassischen Stresshormone Adrenalin, Noradrenalin und Cortisol im Blut. Allerdings kann sowohl bei landwirtschaftlichen Nutztieren aber auch insbesondere bei Wildtieren die notwendige Manipulation für eine Blutprobenentnahme bereits eine akute Stressreaktion auslösen (Cook et al. 2000, Sheriff et al. 2011). In Studien beim Menschen und auch bei Rindern konnte hingegen in der Folge einer akuten Stressreaktion ein zeitverzögerter Anstieg der Cortisolkonzentrationen im Speichel und in der Tränenflüssigkeit beobachtet werden (Banbury 2009, Khraim 2011). Aus diesem Grund wurde im ersten Hauptteil der vorliegenden Dissertation der Einsatz von Tränenflüssigkeit und Speichel bei verschiedenen Robben als mögliche alternative Untersuchungsmaterialien zur Feststellung der von der Beprobungssituation unabhängigen Cortisolkonzentrationen untersucht.

Auch die Evaluation einer möglichen chronischen Stresssystembelastung basiert bislang zumeist auf der alleinigen Analyse der Cortisolkonzentrationen. Allerdings kann in der Folge einer länger anhaltenden und auch intermittierend auftretenden Aktivierung der HPA-Achse

neben einem Anstieg der Cortisolkonzentrationen, ebenfalls ein Abfall sowie ein Ausbleiben einer Cortisolwertänderung beobachtet werden (Ladewig 2000, Miller et al. 2007). Die Durchführung der von Przekop et al. (1985) zur Evaluation einer chronischen Stressreaktion vorgebrachten wiederholten Messung der Cortisolkonzentration ist dabei insbesondere bei Wildtieren und in der intensiven, landwirtschaftlichen Nutztierhaltung zumeist nicht oder nur schwer umzusetzen. In der Humanmedizin werden für eine situationsunabhängige Evaluation einer möglichen chronischen Stresssystemaktivierung zunehmend das Steroidhormon DHEA und sein Sulfatester DHEAS eingesetzt (Parker et al. 1985, Jeckel et al. 2010). Die Vorläufer der Androgene und Östrogene werden hauptsächlich aus der Nebennierenrinde ausgeschüttet und gelten unter anderem als funktionelle Antagonist von Cortisol (Parker und Baxter 1985, Clerici et al. 1997). Neben diesen antiglukokortikoiden Eigenschaften konnten jedoch auch Hinweise für eine immunmodulatorische Wirksamkeit von DHEA im Organismus in verschiedenen Studien festgestellt werden (Kalimi et al. 1994, Hazeldine et al. 2010).

Ziel des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit war es daher mögliche Unterschiede der Cortisol-, DHEA- und DHEAS-Konzentrationen zwischen unterschiedlichen Untersuchungsgruppen bei zwei verschiedenen Tierspezies zu evaluieren. Zum einen erfolgte hierzu eine Probenentnahme bei an den menschlichen Umgang habituierten Seehunden und Kegelrobben unter bekannten Umweltbedingungen wie auch bei freilebenden Seehunden in der Nordsee, die vermeintlichen Umweltstressoren ausgesetzt waren. Die Gruppe der freilebenden Seehunde setzte sich dabei aus gesunden und erkrankten Seehunden zusammen.

Zum anderen wurden gesunde und an einer entzündlichen Produktionskrankheit erkrankte Milchkühe in der zweiten Hälfte der Transitperiode (direkt *postpartum* bis drei Wochen *postpartum*) beprobt.

Im Anschluss an die Analysen der unterschiedlichen Hormone in den verschiedenen Untersuchungsgruppen sollte geprüft werden, ob die untersuchten Parameter sich als Bestandteil eines speziesübergreifenden Belastungsindex eignen, um den Einfluss einer chronischen Stressbelastung valide abzubilden.

7.1. Evaluierung verschiedener Untersuchungsmatrizes zur Feststellung der

Cortisolkonzentration bei freilebenden Seehunden

Die Untersuchung der Cortisolwerte im Blut stellt traditionell die am häufigsten gewählte Methode zur Feststellung des Stressstatus dar. Allerdings kann es, wie bereits erwähnt, im Zuge der Fixation und des Handlings der zu untersuchenden Tiere für die Probenentnahme,

vor allem bei Wildtieren, zu einem akuten Anstieg der Cortisolkonzentration kommen (Sheriff et al. 2011). Im ersten Teil dieser Arbeit erfolgte, aufgrund eines bei Menschen und auch bei Wiederkäuern festgestellten zeitlich verzögerten Anstiegs der Cortisolwerte in der Tränenflüssigkeit und im Speichel (Cook 2002, Banbury 2009, Khraim 2011), die Beurteilung dieser Körperflüssigkeiten als alternative, situationsunabhängige Untersuchungsmaterialien bei wildlebenden Seehunden. In einer weiteren Untersuchung wurde die Analyse der Speichelcortisolwerte bei an den menschlichen Umgang habituierten Seehunden sowie Kegelrobben im Vergleich zu gesunden freilebenden Seehunden angeschlossen. Außerdem konnte bei drei habituierten Seehunden eine Speichelprobe vor und nach der Fütterung untersucht werden.

Cortisol liegt im Speichel als auch in der Tränenflüssigkeit in der ungebundenen, „freien“ Form vor. Der Nachweis von Cortisol in der Tränenflüssigkeit wurde bereits bei Menschen und auch bei Rindern erfolgreich durchgeführt (Banbury 2009, Khraim 2011). Zudem wurde Cortisol auch im Speichel von Hunden und Rindern (Vincent und Michell 1992, Negrao et al. 2004), wie auch bei Menschen (Kirschbaum und Hellhammer 1989, Banbury 2009) nachgewiesen. Die in der Humanmedizin (Kirschbaum und Hellhammer 1989) beschriebene zeitliche Verzögerung der Cortisolwertänderung im Speichel im Vergleich zu den Serumwerten konnte auch in Untersuchungen bei Schafen und Rindern (Cook 2002, Hernandez et al. 2014) festgestellt werden. Es ist zudem bekannt, dass die Konzentration des ungebundenen Cortisols in der Tränenflüssigkeit und im Speichel deutlich niedrigere Werte aufweisen als im Serum. So gaben Kirschbaum und Hellhammer (1989) an, dass die ungebundenen Speichelcortisolwerte des Menschen um ca. 50 % niedriger sind als die im Blut gemessene freie, ungebundene Cortisolfraktion. Die mittleren gemessenen Cortisolwerte in der Tränenflüssigkeit und im Speichel ergaben in einer weiteren Studie bei Menschen (Banbury 2009) sogar um 90 % niedrigere Werte im Vergleich zu der im Serum durchschnittlich gemessenen Gesamtkonzentration (gebundenes und ungebundenes) von Cortisol. In einer Studie zur Stressbelastung von Rindern konnte ebenfalls eine um 99 % geringerer Konzentration des freien Cortisols in der Tränenflüssigkeit im Vergleich zu den Gesamtcortisolwerte im Serum der untersuchten Tiere bestimmt werden (Khraim 2011). Neben Speziesunterschieden sind diese verschiedenen Angaben möglicherweise durch Unterschiede im Studienaufbau und der Durchführung zu erklären. So wurden einerseits verschiedene Cortisolfraktionen im Serum und im Speichel miteinander verglichen (Kirschbaum und Hellhammer 1989). Auch die unterschiedliche Frequenz der

Probenentnahme könnte zu den verschiedenen Angaben geführt haben. Zudem könnten die Unterschiede auch auf die Verwendung verschiedene Analysemethoden zurückgeführt werden.

Basierend auf den Erkenntnissen bei anderen Tierarten und beim Menschen sollte in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, ob Cortisol in der Tränenflüssigkeit und im Speichel von Seehunden und Kegelrobben nachzuweisen ist. Hierbei könnte der beschriebene zeitverzögerte Anstieg der Cortisolwerte im Speichel und vermutlich auch in der Tränenflüssigkeit der freilebenden Seehunde helfen, die eigentliche Cortisolkonzentration vor einer akuten Beeinflussung des Stresssystems durch die Manipulation abzubilden.

Aufgrund der Ergebnisse vorheriger Studien war anzunehmen, dass sich die Cortisollevel in den einzelnen Matrices auch bei den Seehunden unterscheiden und somit durch die vorherige Probenentnahme beeinflusst werden könnten. Daher wurden die Proben zur Validierung der einzelnen Matrix bei allen untersuchten Robben immer in der gleichen Reihenfolge entnommen (Tränenflüssigkeit, Speichel, Blut).

Die in der vorliegenden Arbeit festgestellten Konzentrationen des ungebundenen Cortisols in der Tränenflüssigkeit und im Speichel waren um bis zu 99 % geringer und entsprachen somit weniger als 1% der Gesamtcortisolkonzentrationen im Serum. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Studie von Khraim (2011) bei Kühen, in der die gleichen Nachweisverfahren verwendet wurden. Auch hier entsprachen die Konzentrationen des „freien“ Cortisol in der Tränenflüssigkeit 1 % der Gesamtcortisolkonzentrationen im Serum.

Trotz der niedrigen Cortisolwerte in der Tränenflüssigkeit und im Speichel der untersuchten freilebenden Seehunde konnte in der hier vorliegenden Dissertation sowohl eine deutliche Korrelation zwischen den Cortisolkonzentrationen im Serum und in der Tränenflüssigkeit ($R^2=0.82$, $P < 0.01$) als auch eine belastbare, allerdings geringere Korrelation zwischen den Speichel- und Tränenflüssigkeitsergebnissen ($R^2=0.68$, $P < 0.05$) sowie zwischen Speichel- und Serumcortisol ($R^2=0.60$, $P < 0.05$) festgestellt werden. Banbury (2009) konnte in einer Studie bei Menschen hingegen keine signifikante Korrelation der Cortisolkonzentrationen in der Tränenflüssigkeit und dem Serum nachweisen. Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse zwischen der vorliegenden Dissertation und der Studie von Banbury (2009) könnte sein, dass die Tränenflüssigkeitsprobe bei den Menschen mittels einer Glaskapillare und bei den Seehunden mit Hilfe eines Wattetupfers gewonnen wurde. Dabei könnte der saugfähige Tupfer eine bessere Aufnahme der Tränenflüssigkeit ermöglicht haben. Zudem

wurde vor der Analyse der Tränenflüssigkeits- und Speichelproben der Seehunde das Cortisol mittels eines Ethergemischs aus den Tupfern extrahiert, so dass der Verlust von Probenmaterial minimiert wurde. Auch die verschiedenen verwendeten Analyseverfahren der Cortisolkonzentration im Serum wie auch in der Tränenflüssigkeit und im Speichel in der Studie von Banbury (2009) beim Menschen und in der vorliegenden Arbeit bei den Seehunden könnten zu den unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben. Zudem sind die genauen Mechanismen eines möglichen Übertritts von ungebundenem Cortisol in die Tränenflüssigkeit bisher weder beim Menschen noch bei den verschiedenen Tierarten abschließend geklärt. So wird zwar vermutet, dass das „freie“ Cortisol aus dem Serum ebenfalls in die Tränenflüssigkeit diffundiert, wie unter anderem von Vining et al. (1983) für ungebundenes Speichelcortisol beschrieben wurde. Daher seien auch geringere Konzentrationen des ungebundenen Cortisols im Speichel und in der Tränenflüssigkeit zu finden (Vining et al. 1983). In einer aktuellen Studie von Monk et al. (2014) konnte jedoch bei Pferden vor und nach einem ACTH-Stimulationstests höhere Werte des ungebundenen Cortisols in der Tränenflüssigkeit im Vergleich zum Serum festgestellt werden. Dies könnte einerseits aufgrund einer potentiellen „Verunreinigung“ der Tränenflüssigkeit mit Blut aus einer Wunde am Auge verursacht worden sein. Monk et al. (2014) wiesen allerdings daraufhin, dass auch eine eigene Biosynthese von Cortisol in der Tränendrüse denkbar wäre, wie ebenfalls in der Humanmedizin diskutiert wird (Banbury 2009). Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen ungebundenen Cortisolkonzentrationen in der Tränenflüssigkeit waren allerdings, in Übereinstimmung mit den Erkenntnissen von Vining et al. (1983), geringer als die Gesamtcortisolwerte im Serum. Somit konnte kein Hinweis auf eine „Kontamination“ der Tränenflüssigkeit mit Blut gefunden werden. Zudem könnte die Korrelation zwischen den Konzentrationen des „freien“ Cortisol im Speichel und der Tränenflüssigkeit der Seehunde in Übereinstimmung mit der Arbeit von Banbury (2009) darauf hindeuten, dass die Mechanismen des Übertritts von ungebundenem Cortisol aus dem Blut in den Speichel und die Tränenflüssigkeit bei Robben vergleichbar sind.

Die gute Korrelation zwischen den Cortisolkonzentrationen im Serum und in der Tränenflüssigkeit der freilebenden Seehunde deutet daraufhin, dass die Cortisolkonzentrationen in diesen Untersuchungsmaterialien eher den Werten in der Folge einer akuten Stressreaktion durch die Probenentnahme entsprechen. So konnte auch Khraim (2011) eine entsprechende Korrelation zwischen den Cortisolwerten im Serum und der Tränenflüssigkeit bei Rindern in der Folge einer akuten Stresssituation feststellen. Somit wäre die Tränenflüssigkeit nicht geeignet, um als alternatives Untersuchungsmaterial die von der

Beprobungssituation unbeeinflussten Cortisolwerte abzubilden. Diese Annahme beruht allerdings auf einer geringen Probenanzahl ($n=17$). Daher sollten die Ergebnisse in weiteren Studien anhand einer größeren Probenzahl reevaluiert werden. Zur besseren Einschätzung sollte hierbei darauf geachtet werden, neben den Gesamtcortisolkonzentrationen auch die ungebundene Cortisolfraktion im Serum im Vergleich zu dem „freien“ Cortisol in der Tränenflüssigkeit zu bestimmen.

Die weiteren durchgeführten Analysen der Cortisolkonzentrationen im Speichel der habituierten Seehunden und Kegelrobben verglichen mit den festgestellten Speichelcortisolwerten der freilebenden Seehunde ergaben keine signifikanten Unterschiede. Jedoch konnte innerhalb der Gruppe der habituierten Robben höhere Speichelcortisolwerte bei den habituierten Seehunden verglichen mit den habituierten Kegelrobben festgestellt werden ($P < 0.05$). Mögliche Erklärungen hierfür könnten eine interindividuellen oder auch einer zwischenartlichen Varianz sein, wie sie auch von Pérez et al. (2004) bei Rindern beschrieben wurden. Zudem sind mögliche Unterschiede in der Durchführung der Probenentnahme in Betracht zu ziehen, wie zum Beispiel die Dauer des Belassens des Wattetampons der Salivette in der Maulhöhle als auch eine Beeinflussung der Speichelsekretionsmenge und –zusammensetzung zu unterschiedlichen Tageszeiten.

Die festgestellten vergleichbaren Speichelcortisolwerte zwischen den Gruppen der habituierten Robben und der freilebenden Seehunde könnten hingegen einerseits darauf hindeuten, dass die Speichelprobenentnahme auch bei den habituierten Seehunden und Kegelrobben eine akute Stressreaktion ausgelöst haben könnte. Zum anderen ist es ebenfalls möglich, dass die im Speichel der wildlebenden Seehunde gemessene Cortisolkonzentration tatsächlich dem basalen Cortisollevel vor einem durch die Manipulation verursachten akuten Anstieg der Cortisolwerte entspricht. Eine Beeinflussung der Cortisolkonzentration durch die Nahrung scheint dabei aufgrund der vergleichbaren Cortisolwerte vor und nach der Fütterung im Speichel der habituierten Seehunde eher unwahrscheinlich. Da es sich bei diesen erhobenen Daten allerdings um eine erste orientierende Studie handelt, sind weitere Untersuchungen notwendig um mögliche Fehlinterpretationen zu vermeiden. Für Hundsrobben (*Phocidae*), insbesondere für Seehunde und Kegelrobben, liegen bisher kaum Studien zu den grundlegenden Mechanismen der Aktivierung der HPA-Achse vor. Gulland et al. (1999) konnten zwar in einer Untersuchung beim Pazifischen Seehund (*Phoca vitulina richardsi*) einen Anstieg der Cortisolkonzentrationen im Serum in der Folge eines ACTH-Stimulationstests feststellen. Jedoch wurden in dieser Studie keine Messungen von Cortisol in

anderen Materialien wie beispielsweise Speichel durchgeführt. Die Klärung der Hypothese eines möglichen zeitversetzten Anstiegs der Cortisolwerte im Speichel von Hundsrobben steht somit weiter aus. In zukünftigen Studien sollte daher einerseits wiederholte Messungen der Cortisolwerte im Speichel bei einzelnen und auch vergleichend bei verschiedenen Robben und auch Robbenarten durchgeführt werden, um intra- sowie interindividuelle und zwischenartliche Varianzen näher zu beleuchten. Zudem sollte ein möglicher zeitlich versetzter Anstieg der Cortisolwerte mit Hilfe eines definierten akuten Stressors oder eines ACTH-Stimulationstests näher untersucht werden. Auch die zusätzliche Bestimmung der Konzentrationen von Dehydroepiandrosteron im Speichel könnte helfen eine bessere Aussage über die Aktivität der HPA-Achse zum Zeitpunkt der Untersuchung zu erhalten.

7.2. Evaluation von Cortisol, Dehydroepiandrosteronsulfat und Dehydroepiandrosteron bei Seehunden und Kegelrobben

Mögliche Einflüsse chronisch oder kumulierend auftretender anthropogener Stressoren auf verschiedene Wildtierspezies, so auch auf Meeressäuger, werden zunehmend in der Literatur diskutiert (Wingfield et al. 1997, Fair and Becker 2000, Wikelski und Cooke 2006). Neben der Feststellung des direkten Einfluss auf verschiedene Organsystem und auf die Nutzung des Habitats von Meeressäugern werden hierbei auch indirekte Interaktionen des Stresssystems unter anderem mit dem Immunsystem beschrieben (Wright et al. 2007, Kakuschke und Prange 2007, Weirup et al. 2013). Die objektive Feststellung einer möglichen chronischen Aktivierung des Stresssystems gewinnt hierbei zunehmend an Bedeutung. Die aussagekräftige Bestimmung von Cortisol im Blut bei freilebenden Meeressäugern ist aufgrund der bereits beschriebenen Abhängigkeit von der Beprobungssituation limitiert. In der Humanmedizin werden daher die Hormone DHEAS und DHEA zunehmend als Marker für chronischen Stress eingesetzt. In der vorliegenden Dissertation erfolgte die Beurteilung möglicher Unterschiede von Cortisol, DHEAS und DHEA bei Seehunden und Kegelrobben in drei Untersuchungsgruppen.

7.2.1. Untersuchungsgruppen

In der vorliegenden Arbeit wurden einerseits an den menschlichen Umgang habituierte Seehunde und Kegelrobben beprobt. Diese Tiere leben innerhalb eines umgrenzten Areals unter definierten Umgebungsbedingungen. Zudem sind diese Robben im Rahmen des regelmäßigen, freiwilligen medizinischen Trainings an die Probenentnahme durch den Menschen gewöhnt. Die notwendige Manipulation für die Probenentnahme ist den Tieren

bekannt und stellt somit einen vermeintlichen „vorhersagbaren“ Stimulus dar (Wingfield et al. 1997, Koolhaas et al. 2011). Eine mögliche denkbare Beeinflussung durch äußere Umweltbedingungen wie beispielsweise jahreszeitliche Schwankungen wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit, aufgrund der geringen Probenanzahl, nicht näher evaluiert.

Im Vergleich hierzu wurden in der Nordsee freilebende Seehunde untersucht, die aufgrund der frequenten wirtschaftlichen Nutzung (Schifffahrt, Fischerei, Bau von Offshore Windkraftanlagen) weiter Teile der Nordsee womöglich potentiellen „unvorhersagbaren“, anthropogenen Stressoren ausgesetzt waren (Wingfield et al. 1997, Fair und Becker 2000, Wright et al. 2007). Als eine mögliche Folge einer Akkumulation oder des kontinuierlichen Auftretens dieser unvorhersagbaren Stressoren ist, aufgrund einer chronischen Aktivierung des Stresssystems, das Auftreten einer Maladaptation der Regulationsmechanismen beschrieben (McEwen und Stellar 1993, Wingfield et al. 1997). Eine solche Maladaptation könnte wiederum eine Fehlregulation der von Besedovsky und Rey (1996) erwähnten komplexen neuro-immune-endokrinen Interaktionen im Organismus nach sich ziehen. Hierbei könnte einerseits eine Beeinflussung des Immunsystems durch beispielsweise fehlregulierte neuro-endokrine Abläufe im Rahmen einer chronischen Stressreaktion auftreten (Dantzer und Kelley 1989, McEwen et al. 1997). Haebler und Moeller (1993) zufolge, kann auch eine Stressbelastung selbst als zusätzlicher immunschwächender Auslöser bei verschiedenen insbesondere viralen Erkrankungen von Meeressäugern fungieren. Andererseits können auch Krankheiten oder ein schlechter Ernährungszustand zu einer Belastung des Immun- und/oder Stresssystems führen (Chandra 1997, Marcos et al. 2003). In verschiedenen Studien bei Nördlichen See-Elefanten (*Mirounga angustirostris*, Ortiz et al. 2003) und auch bei Stellernen Seelöwen (*Eumetopias jubatus*, du Dot et al. 2009) konnte beispielweise gezeigt werden, dass eine negative Energiebilanz, welche aufgrund hoher Werte von nicht veresterten Fettsäuren (NEFA) vermutet wurde, positiv mit hohen Cortisolkonzentrationen, als Anzeichen einer Aktivierung des Stresssystems, korrelierten.

Aufgrund dieser multiplen Wechselbeziehungen zwischen dem Immun-, Nerven- und Stresssystem wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl 16 gesunde als auch neun erkrankte, freilebende Seehunde untersucht um mögliche Unterschiede in den Konzentrationen von Cortisol, DHEA und DHEAS zu evaluieren.

Hierbei wäre für die genaue Einschätzung, insbesondere der Einsatzfähigkeit und Aussagekraft des erstmals bei Robben zur Analyse einer potentiellen Stressbelastung eingesetzten Steroidhormons DHEA, sowohl eine höhere Anzahl der untersuchten Tiere als auch vergleichbare Umweltbedingungen, wie Untersuchungsort und Jahreszeit wünschenswert

gewesen. Aufgrund des eingeschränkten Zugangs zu den Wildtieren ist dies jedoch mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden.

7.2.2. Cortisol

Die untersuchten habituierten Seehunde und Kegelrobben zeigten deutlich niedrigere Cortisolwerte im Vergleich zu den gesunden und erkrankten freilebenden Seehunden. Dieses Ergebnis wird durch die Beobachtungen von Desportes et al. (2007) gestützt. In dieser Studie konnten bei in menschlicher Obhut lebenden Schweinswalen (*Phocoena phocoena*) gezeigt werden, dass eine regelmäßig trainierte Blutprobenentnahme auf freiwilliger Basis innerhalb des Wasserbeckens zu niedrigeren Cortisolwerten führte. Im Gegensatz hierzu zeigten die gleichen Tiere deutlich erhöhte Werte, wenn die Blutprobenentnahme, hingegen der üblichen Trainingssituation, außerhalb des Wasserbeckens stattfand. Auch Riviere et al. (1977) konnten bei in Gefangenschaft lebenden und an den menschlichen Umgang habituierten Seehunden mit den in dieser Dissertation vergleichbare Cortisolwerte feststellen. Allerdings wurde in der Studie von Riviere et al. (1977) eine andere Labormethode zur Messung der Cortisolwerte verwendet.

Die zeitgleiche Untersuchung von an die Probenentnahme gewöhnte Tiere als eine Kontrollgruppe, schlugen auch Cook et al. (2000) bei der Durchführung einer „hands-on“ Studie vor, um eine Einschätzung der durch die notwendige Manipulation potentiell hervorgerufenen akuten Stressantwort zu ermöglichen. Der Hintergrund hierbei ist, dass eine sich wiederholende, gleichbleibende und somit „vorhersehbare“ Trainingssituation zu einer „gradueller Abnahme“ der Stressantwort führen kann, die als Habituation bezeichnet wird (Thorpe 1944, Thompson und Spencer 1966, Koolhaas et al. 2011). Allerdings unterliegt der „Grad“ der Habituation auch individuellen Schwankungen (Thompson und Spencer 1966). So konnten in der hier vorliegenden Arbeit Unterschiede in den Cortisolwerten (*Min-Max* 11,1–67,2 ng/ml) der verschiedenen habituierten Seehunde und Kegelrobben gefunden werden, die allerdings statistisch nicht signifikant waren. Auch bei den Schweinswalen in der Studie von Desportes et al. (2007) konnten individuell variierende Cortisolwerte festgestellt werden, was sich mit den Ergebnissen der eigenen Untersuchung deckt.

Die Cortisolkonzentrationen der freilebenden Seehunde waren im Vergleich zu den Werten der habituierten Robben deutlich höher. Allerdings waren die Cortisolkonzentrationen zwischen den gesunden und erkrankten freilebenden Seehunden unabhängig vom Gesundheitsstatus vergleichbar. Koolhaas et al. (2011) zufolge, ist die Stärke der

Stressreaktion und der damit verbundene Anstieg der Cortisolkonzentration abhängig von der „Wahrnehmung“ einer Situation als Bedrohung für das Gleichgewicht der Körperfunktionen („Homöostase“, Cannon 1932). Die signifikanten Unterschiede der Cortisolkonzentrationen zwischen den trainierten Robben und den wildlebenden Seehunden in der vorliegenden Arbeit könnten somit möglicherweise auf eine unterschiedliche „Wahrnehmung“ der Beprobungssituation als bedrohlich zurückzuführen sein. Dieser Annahme folgend, könnte die Probenentnahme für die habituierten Robben vermutlich eine „vorhersehbare“ Situation dargestellt haben, die demnach zu keiner signifikanten Änderung der Cortisolkonzentration führte. Die freilebenden Seehunde hingegen könnten das Einfangen und die Probenentnahme wahrscheinlich als eine „unvorhersehbare“ und somit „nicht kontrollierbare“ Situation wahrgenommen haben, die eine Aktivierung der HPA-Achse ausgelöst haben könnte (Wingfield et al. 1997, Koolhaas et al. 2011). Eine zeitgleiche Dokumentation des Verhaltens der untersuchten Tiere wäre hierbei gegebenenfalls sinnvoll gewesen, um diese Hypothese zu untermauern und sollte daher in weiteren Studien beachtet werden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Dissertation konnte in einer Studie von Oki und Atkinson (2004) deutlich niedrigere Cortisolwerte in wildlebenden Seehunden gemessen werden. Die Blutentnahme bei den von Oki und Atkinson (2004) untersuchten Seehunden erfolgte jedoch über einen 24 Stunden vor der Probenentnahme gelegten Venenverweilkatheter. Diese zeitlich versetzte Blutentnahme könnte somit, wie auch bei anderen Tierarten beschrieben (Hopster et al. 1999), aufgrund einer „Anpassungsreaktion“ des Stresssystems der freilebenden Seehunde an die Manipulation durch den Menschen zu den niedrigeren Cortisollevel geführt haben. In der hier vorliegenden Arbeit war es hingegen nicht möglich, insbesondere bei den freilebenden Seehunden, mehrere aufeinander folgende Blutentnahmen durchzuführen. Dies hätte eine vergleichende Beurteilung der Verläufe der Cortisolkonzentrationen, unabhängig von der verwendeten Labormethode, ermöglicht.

Bei den wildlebenden Seehunde, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beprobt wurden, erfolgte die Probenentnahme hingegen direkt im Anschluss an das Einfangen und Fixieren der Tiere. Auch bei freilebenden jungen Nördlichen See-Elefanten (*Mirounga angustirostris*) konnten direkt nach dem Fangen höhere Cortisolwerte in der Folge einer akuten Stresssituation im Vergleich zu einer Kontrollgruppe festgestellt werden (Champagne et al. 2012). In Übereinstimmung mit den Beobachtungen dieser Studie reflektieren die erhöhten Cortisolwerte der freilebenden Seehunde somit höchstwahrscheinlich ebenfalls eine akute Stressreaktion, die vermutlich durch das Einfangen und die Manipulation erfolgte und zwischen den Gruppen vergleichbar war.

Die in dieser Dissertation erhobenen Ergebnisse machen deutlich, dass die gemessenen Cortisolkonzentrationen sowohl im Blut als auch in der Tränenflüssigkeit durch die Entnahmeprozedur und das damit verbundene Handling beeinflusst werden. Eine einmalige Bestimmung der Cortisolkonzentration, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, erlaubt daher keine Aussage über eine mögliche chronische Aktivierung des Stresssystems. Die von Przekop et al. (1985) und Cohen et al. (1997) vorgebrachte mehrmalig wiederholte Cortisolmessung zur Feststellung des zeitlichen Verlaufs der Cortisolwertänderung ist jedoch aufgrund eines erschwerten Zugangs zu den zu untersuchenden Tieren nicht immer möglich. Auch bei dem Einsatz alternativer Untersuchungsmaterialien wie Speichel wäre eine mehrmalige Probenentnahme zur Feststellung einer chronischen Stresssystemaktivierung notwendig.

Zudem kann auch eine Reduktion der Cortisolwerte, wie sie Burchfield (1979) und Ladewig (2000) einerseits als eine der möglichen Folgen einer chronisch intermittierenden Aktivierung der HPA-Achse beschreiben, ebenso im Rahmen der Habituation beobachtet werden (Thompson und Spencer 1966, Koolhaas et al. 2011). Vor diesem Hintergrund muss auch die in dieser Dissertation erfolgte Einteilung der trainierten Robben als „habituiert“ kritisch hinterfragt werden. So könnte zwar das von den trainierten Robben gezeigte Verhalten (keine Abwehrbewegungen oder Unruhe während der Entnahme) während der Blutprobengewinnung als ein zusätzlicher Hinweis für eine Habituation gedeutet werden. Eine objektive Unterscheidung einer Habituation von einer möglichen chronischen Stresssystemaktivierung anhand der einzelnen Cortisolwerte ist allerdings nicht möglich. Für eine belastbare Einschätzung einer möglichen chronischen Aktivierung des Stresssystems und der Unterscheidung einer solchen länger andauernden Belastung sowohl von einer akuten Stressreaktion als auch von einer möglichen Habituation wären situationsunabhängige Parameter erforderlich.

7.2.3. DHEAS und DHEA

Als Hauptbildungsort der Steroidhormone DHEAS und DHEA wird in der Literatur die Zona reticularis der Nebennierenrinde genannt (Abraham 1974, Endoh et al. 1996). Allerdings werden auch andere Produktionsorte vermutet (Nieschlag et al. 1973, Longcope 1986). DHEAS gilt als Transportform von DHEA, wodurch es beim Menschen in höhere Konzentrationen vorkommt (Nieschlag et al. 1973). Die adrenale Produktion von DHEA, wie auch von Progesteron und Cortisol, erfolgt aus dem Vorläuferhormon Pregnenolon. Aufgrund des gemeinsamen Bildungswegs von DHEA und Cortisol aus Pregnenolon kann es in der

Folge einer gesteigerten hypophysären ACTH-Freisetzung zu unterschiedlichen Interaktionen zwischen den Hormonen kommen. So konnten Oberbeck et al. (1998) während einer akuten Aktivierung der HPA-Achse sowohl ein Anstieg von Cortisol als auch von DHEA und DHEAS verzeichnen. Hingegen zeigte sich in verschiedenen Studien eine metabolische Verschiebung, die mit der Abnahme der DHEA- und der Zunahme der Glukokortikoidproduktion während einer insbesondere länger anhaltenden physischen oder psychischen Stressantwort einhergeht (Parker et al. 1985). Laut Guilliams und Edwards (2010) führt hierbei die gesteigerte Ausschüttung von ACTH aus dem Hypothalamus zu einer vermehrten Cortisolbildung aus dem Vorläufer Pregnenolon in der Nebenniere. Folglich kommt es durch eine verminderte Verfügbarkeit des Steroidhormonvorläufers Pregnenolon zu einer Reduktion der DHEA-Produktion und nachfolgend vermutlich auch zu geringeren DHEAS-Werten.

Aufgrund dieser Beobachtungen werden DHEA und zum Teil auch DHEAS neben Cortisol zunehmend bei Menschen und verschiedenen Tierspezies als zusätzliche vielversprechende Parameter zur Einschätzung insbesondere einer chronischen HPA-Aktivität eingesetzt (Guilliams und Edwards 2010, Konduru 2012).

7.2.3.1. DHEAS

In einer humanmedizinischen Arbeit zur Stressbelastung von Pflegepersonal konnten Jeckel et al. (2010) zeigen, dass die DHEAS-Werte von Pflegekräften, die chronischem Stress ausgesetzt waren, verglichen mit einer Kontrollgruppe deutlich niedrigere Konzentrationen aufwiesen. Bei den Pflegekräften waren zudem niedrigere, morgendliche Speichelcortisolwerte feststellbar, die auch im Rahmen einer chronisch intermittierenden Stressreaktion beobachtet werden können (Burchfield 1979).

Im Gegensatz zu der Studie von Jeckel et al. (2010) zeigten junge männliche Rhesusaffen, die eine Woche lang über zwei Stunden täglich auf einem Zwangsstuhl fixiert wurden eine Zunahme der DHEAS- jedoch eine Abnahme der Cortisol-Konzentrationen im Verlauf des Versuches (Maninger et al. 2010). Zu Beginn der Zwangsmaßnahme konnte hierbei zwar sowohl ein Anstieg der Cortisol- als auch der DHEAS-Werte festgestellt werden. Die Cortisol-Konzentrationen nahmen allerdings über den Versuchszeitraum ab, wohingegen weiterhin erhöhte DHEAS-Werte am Ende der Versuchswoche nachgewiesen wurden. Den Autoren zufolge könnte die Abnahme der Cortisolkonzentrationen im Verlauf des durchgeführten Versuchs einerseits auf eine „physiologische Adaptation“ und damit auf eine Reduktion der HPA-Achsen-Aktivität hindeuten. Andererseits könnten niedrigen Cortisol-

Werte auch bei einer chronischen Aktivierung des Stresssystems beobachtet werden. Hierbei könnten, laut Maninger et al. (2010), auch die erhöhten DHEAS-Werte als ein möglichen Hinweis für den regulativen Einfluss dieses Steroidhormons auf eine vermeintlich chronisch aktivierte HPA-Achse angesehen werden.

Die DHEAS-Konzentrationen in der vorliegenden Arbeit zeigten weder bei den Robben noch bei den untersuchten Milchkühen signifikante Unterschiede zwischen den drei Untersuchungsgruppen. Auch die DHEAS-Werte zwischen den Altersklassen oder den Geschlechtern der Robben in der vorliegenden Arbeit waren vergleichbar. Allerdings beruhen diese Beobachtungen auf einer vergleichsweise geringen Probenzahl in den einzelnen Untersuchungsgruppen, da der Zugang insbesondere zu den Wildtieren für entsprechende Untersuchungen erschwert ist. Somit konnte keine homogene Verteilung der verschiedenen Altersklassen oder der Geschlechter innerhalb der Untersuchungsgruppen gewährleistet werden, wodurch potentielle Unterschiede in der vorliegenden Arbeit möglicherweise statistisch nicht zu erfassen waren. In Studien mit einer deutlich höheren Probenzahl konnten im Gegensatz hierzu beispielsweise Ortenreich et al. (1984) eine Abnahme der DHEAS- wie auch Labrie et al. (1997) geringere DHEA-Werte beim Menschen mit zunehmendem Alter nachweisen. Außerdem konnten Ortenreich et al. (1984) ebenfalls höhere DHEAS-Werte bei Männern im Vergleich zu Frauen feststellen. In einer Studie von Mühlenbein et al. (2003) zeigten auch verschiedene Backentaschenaffen (*Cercopithecinae*) eine Abnahme der DHEAS-Konzentrationen mit steigendem Alter.

In der vorliegenden Dissertation wiesen allerdings die untersuchten Kegelrobber der Gruppe der habituierten Tiere numerisch niedrigere DHEAS-Werte auf, als die untersuchten Seehunde der gleichen Gruppe. Ein möglicher speziesbedingter Unterschied der DHEA-Werte wurde in einer Publikation von Buckham-Sporer et al. (2008a) bei Mastrindern beschrieben. Auch in der Arbeit von Mühlenbein et al. (2003) konnten signifikante, speziesbezogene Unterschiede der DHEAS- und DHEA-Konzentrationen zwischen den drei beprobten Primatenarten nachgewiesen werden. Ein möglicher DHEAS-Unterschied zwischen den in dieser Dissertation untersuchten Robbenarten stellt, aufgrund der niedrigen Probenanzahl, allerdings nur eine Vermutung dar. Weitere Untersuchungen zu der physiologischen Funktion sowie denkbaren Beeinflussungen der DHEAS-Konzentrationen durch das Alter oder auch die Haltungsform sind daher notwendig. Hierbei sollten auch mögliche Unterschiede des Reproduktionsstatus auf die Sexualhormonvorläufer DHEA und DHEAS evaluiert werden. So konnten beispielweise Perret und Aujard (2005) während der Fortpflanzungsphase höhere DHEAS-Werte bei männlichen Lemuren (*Microcebus murinus*)

jedoch geringe Konzentrationen während der Keimruhe im Winter nachweisen. Browne et al. (2006) stellten hingegen bei weiblichen Nördlichen Seebären (*Callorhinus ursinus*) eine höhere Konzentrationen der bioaktiven Form DHEA während der physiologisch auftretenden Keimruhe im Vergleich zur verzögert einsetzenden Implantationsphase fest. Dies wurde von den Autoren als Hinweis für die Beteiligung und Regulation von DHEA an der Androgensynthese in Seebären gewertet. Für Seehunde oder Kegelrobben sind in der Literatur jedoch bisher keine vergleichbaren Untersuchungen zu DHEA oder DHEAS zu finden.

Des Weiteren sollte in zukünftigen Arbeiten versucht werden eine höhere Anzahl miteinander vergleichbarer Studientiere zu beproben um eine genauere Einschätzung der erhobenen Daten, auch beispielsweise im Rahmen der Beurteilung einer möglichen Stresssystemaktivierung, zu ermöglichen.

7.2.3.2. DHEA

Der Einsatz der bioaktiven Form DHEA als möglicher Stressparameter wurde in einer Arbeit von Newman et al. (2013) bei Singammern (*Melospiza melodia*) evaluiert. In dieser Studie zeigten männliche Singammer, die sich während der gesamten Fortpflanzungsphase in einem Bereich mit einer höheren Anzahl an Prädatoren aufhielten, niedrigere DHEA-Werte im Gegensatz zu vergleichbaren Tieren in Bereichen mit einer geringeren Anzahl an Räubern. Die niedrigen DHEA-Werte der Singammern, die einem vermeintlichen größeren, chronischen Prädatorendruck ausgesetzt waren, wiesen zudem keine signifikante Änderung infolge einer zusätzlichen akuten Stresssituation auf.

Die Corticosteron-Konzentrationen hingegen ergaben keinen Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen. Eine weitere akute physische Bewegungseinschränkung führte allerdings insbesondere in der Fortpflanzungszeit in beiden Untersuchungsgruppen zu einem deutlichen Anstieg der Corticosteron-Konzentrationen. Die Autoren schlussfolgerten hieraus, dass die alleinige Corticosteron-Messung nicht ausreichend zu sein scheint um eine chronische Stressreaktion sicher beurteilen zu können. Die zeitgleiche Bestimmung der DHEA-Konzentrationen könne daher eine bessere Einschätzung der Auswirkungen einer chronischen Stressbelastung bei Singammern ermöglichen.

In der vorliegenden Dissertation wiesen die DHEA-Werte der habituierten Seehunde und Kegelrobben keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den beiden Gruppen der freilebenden Seehunde auf. Allerdings zeigten die habituierten Robben den geringsten Cortisol/DHEA-Quotienten unter den drei Untersuchungsgruppen. Williams und Edwards

(2010) beschreiben in ihrer Publikation den Cortisol/DHEA-Quotienten als ein wichtiges Hilfswerkzeug zur Einschätzung der Funktionalität der HPA-Achse. In Übereinstimmung mit den festgestellten geringen Cortisolwerten der habituierten Robben könnte der niedrige Cortisol/DHEA-Quotient die Hypothese einer geringen Aktivierung der HPA-Achse durch die Probenentnahme, wie sie im Rahmen der Habituation beschrieben wurde (Thorpe 1944), somit womöglich unterstützen. Die zeitgleiche Analyse von Cortisol und DHEA könnte daher bei trainierten Seehunden und Kegelrobben ein hilfreiches Messinstrument darstellen, um eine mögliche Habituation an die Beprobungssituation objektiv zu evaluieren.

Im Vergleich zu den habituierten und auch den erkrankten, freilebenden Robben konnte in der Gruppe der gesunden, freilebenden Seehunde die höchsten DHEA-Werte nachgewiesen werden. In der Literatur sind hierzu unterschiedliche Angaben zu finden. So konnten Oberbeck et al. (1998) neben höheren Cortisolwerten auch einen Anstieg der DHEA-Konzentrationen im Rahmen einer akuten, physischen Stresssituation bei Menschen beobachten. Weitere Studien beschreiben das Auftreten von höheren DHEA-Konzentrationen als Hinweis für einen möglichen regulatorischen Einfluss auf die HPA-Achsen-Aktivität (Shealy 1995, Sanning 2010). Des Weiteren werden immunmodulatorische Eigenschaften von DHEA beispielweise auf die zelluläre Immunantwort während Entzündungsprozessen bei Menschen und verschiedenen Nagetieren vermutet (Casson et al. 1993, Oberbeck et al. 2001, Knöferl et al. 2003).

Die habituierten Robben wiesen den niedrigsten Cortisol/DHEA-Quotient in der vorliegenden Arbeit auf, gefolgt von einem höheren Quotienten der gesunden, freilebenden Seehunden ($P < 0,01$) und dem im Vergleich zu den anderen beiden Untersuchungsgruppen höchsten Cortisol/DHEA-Quotienten der erkrankten, freilebenden Seehunde ($P < 0,001$). Der Quotient, als Hilfsmittel für die Beurteilung der Funktion der HPA-Achse (Guilliams und Edwards 2010), könnte hierbei möglicherweise eine andauernde Modifikation des Stresssystems zum Beispiel im Zuge einer chronisch-intermittierenden Stressreaktion hervorheben (Ladewig 2000). Aufgrund der verschiedenen, beschriebenen Möglichkeiten des Auftretens erhöhter DHEA-Konzentrationen sind für eine belastbare Interpretation der in dieser Dissertation festgestellten Analyseergebnisse der gesunden, freilebenden Seehunde allerdings weitere Studien unter definierten und bekannten Bedingungen notwendig.

Die festgestellten DHEA- und auch Cortisol-Konzentrationen der erkrankten Seehunde zeigten mit den Ergebnissen der Studie von Newman et al. (2013) vergleichbare Tendenzen.

So waren, wie bereits erwähnt, die Cortisolkonzentrationen bei den erkrankten und den gesunden, freilebenden Seehunde vergleichbar. Allerdings wiesen die freilebenden, erkrankten Seehunden niedrigere DHEA-Werte auf, die sich signifikant von den DHEA-Konzentrationen der freilebenden, gesunden Seehunden unterschieden ($P < 0,05$). In Übereinstimmung mit der Studie von Newman et al. (2013) könnten die niedrigeren DHEA-Werte der erkrankten Wildtiere somit möglicherweise auf eine chronische Aktivierung der HPA-Achse hinweisen, die vermutlich bereits vor dem Einfangen und der Probenentnahme bestand oder hierdurch potenziert wurde. Auch der signifikant höhere Cortisol/DHEA-Quotient könnte dabei als ein Anzeichen einer Fehlregulation in der Folge einer chronischen Hyperreaktivität der HPA-Achse gedeutet werden (Guilliams und Edwards 2010, Konduru 2012). Eine solche vermutete chronische Stresssystemaktivierung kann aufgrund der bereits erwähnten komplexen neuro-immune-endokrinen Interaktionen (Besedovsky und Rey 1996) unterschiedliche Ursachen haben. In Übereinstimmung mit den erhobenen *postmortem* Befunden der erkrankten Seehunde in dieser Dissertation, stellten Siebert et al. (2007) als häufigste Krankheitsursachen der in den Jahren 1996-2005 im Rahmen des Totfundmonitoring untersuchten Seehunde in Schleswig-Holstein eine parasitär oder bakteriell verursachte Bronchopneumonie und das Auftreten von Septikämien fest. Eine entzündliche Infektion des Respirationstrakts bei marinen Meeressäugern ist hierbei klinisch häufig mit einer Dyspnoe assoziiert. In der Folge einer Dyspnoe können dabei neben einer Hypoxie auch eine Hyperkapnie auftreten (Epstein et al. 1995). In mehreren Studien bei Mischlingshunden zeigten Raff et al. (1981, 1983), dass eine Hypoxie wie auch eine Hyperkapnie eine Aktivierung der HPA-Achse verursachten. Eine Hypoxie führe so, vermutlich in der Folge der Stimulation peripherer Chemorezeptoren, zu einem Anstieg der ACTH-Konzentrationen. Im Zuge einer schwerwiegenden Hyperkapnie konnten ebenfalls höhere Corticosteroid-Werte bei den untersuchten Hunden festgestellt werden. Neben einem solchen denkbaren direktem Einfluss auf die HPA-Achse könnte bei den in der vorliegenden Arbeit beprobten erkrankten Seehunde die gestörte Lungenfunktion zudem zu verkürzten Tauchzeiten und einer verringerten Nahrungssuche geführt haben. In der Folge eines reduzierten Tauchvermögens werden laut Kennedy et al. (1989) und Samuel et al. (2001) häufig eine sekundäre Anorexie und Abmagerung bei verschiedenen Robbenarten beobachtet. Eine hiermit verbunden negative Energiebilanz kann dabei als ein zusätzlicher Stressor fungieren (Chandra 1997, Marcos et al. 2003). Darüber hinaus kann ein chronischer Mangel an Energiereserven laut McEwen und Wingfield (2003), aufgrund der zentralen Rolle des Energiestoffwechsels zum Erhalt der Körperfunktionen und der Bereitstellung zusätzlicher

Energie besonders während einer Stresssituation, auch eine Überbelastung der Regulationsmechanismen hervorrufen. Du Dot et al. (2009) stellten beispielsweise bei in menschlicher Obhut lebenden Stellerschen Seelöwen als Hinweis auf einen „Ernährungsstress“ in den Wintermonaten einen Anstieg der Gesamtcortisolkonzentrationen in der Folge einer Abnahme der Körpermasse aufgrund einer reduzierten Energieaufnahme fest. Zeitgleich konnten auch geringere Werte des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors-I (IGF-I), als Marker für eine negative Energiebilanz (Spicer et al. 1990), im Zuge einer verringerten Energiezufuhr bei den Seelöwen beobachtet werden.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten erkrankten, freilebenden Seehunde zeigten in Übereinstimmung mit der Studie von Du Dot et al. (2013) ebenfalls neben den als mäßig bis schlecht eingestuften Ernährungszuständen, erniedrigte IGF-I-Konzentrationen. Eine gegenseitige Beeinflussung der negativen Energiebilanz und der HPA-Achse im Rahmen einer chronischen Aktivierung des Stresssystems der in der vorliegenden Arbeit untersuchten erkrankten, freilebenden Seehunde wäre daher ebenfalls denkbar. Allerdings wäre für eine sichere Abklärung dieser Wechselbeziehungen eine Verlaufsstudie an einer größeren Tiergruppe sinnvoll.

Die in dieser Dissertation gewonnen Erkenntnisse weisen daraufhin, dass DHEA und DHEAS als zusätzliche hilfreiche Parameter zur Einschätzung der Funktion der HPA-Achse dienen könnten. Jedoch stellen die erhobenen Schlussfolgerungen nur erste Hypothesen dar. Da in der vorliegenden Arbeit keine Aufzeichnungen über die näheren Lebensumstände oder auch potentieller anthropogener Interaktionen der untersuchten Tiere gewonnen werden konnten, ist eine abschließende Bewertung einer denkbaren Einflussnahme sowie deren möglichen Ausmaß auf die DHEA- und DHEAS- Konzentrationen nicht sicher möglich. Auch der Einfluss des Alters und des Reproduktionsstatus auf diese Steroidhormone sollte näher evaluiert werden. Weitere Studien sind daher notwendig, um die in dieser Dissertation vermuteten Interaktionen bei den untersuchten Robbenarten abzuklären und gegebenenfalls zu verifizieren. Denkbare Forschungsansätze wären hierbei eine Verlaufskontrolle der DHEA- und DHEAS- Konzentrationen bei in Gefangenschaft lebenden Robben unterschiedlichen Geschlechts sowie im jahreszeitlichen Verlauf. Zudem könnten jüngere erkrankte, freilebende Seehunde oder Kegelrobben unter definierten Bedingungen während der Rehabilitation in einer Auffangstation beprobt werden. Hierbei könnten auch immunologische Marker, wie beispielsweise pro- und antiinflammatorische Zytokine helfen, eine mögliche Interaktion zwischen dem Immunstatus und der Funktion der HPA-Achse näher zu beleuchten. Zur

Abklärung des Einsatz von DHEA und DHEAS als Indikator für eine Beeinflussung des Stresssystems freilebender Robben durch anthropogene Stressoren könnte zudem Proben von Robben aus durch den Menschen frequent genutzten Bereichen, wie der Nordsee, mit Probenmaterial aus weniger anthropogen beeinflussten Gebieten, wie der Arktis, verglichen werden.

7.3. Evaluation von Cortisol, Dehydroepiandrosteronsulfat und Dehydroepiandrosteron bei Milchkühen

Die Transitphase der Milchkuh gilt als eine sensitive Phase in der es zu enormen endokrinologischen, metabolischen und immunologischen Umstellungen kommt (Grummer 1995). Einer Studie von Zwald et al. (2004) zufolge zeigen bis zu 50 % der Milchkühe in der ersten 30 Tagen *postpartum* klinische Anzeichen einer Metritis. In Untersuchungen von Sheldon et al. (2008) konnte eine Prävalenz von 25-40 % in den ersten zwei Wochen *postpartum* festgestellt werden, die zudem unter anderem mit einer reduzierten Milch- und auch Reproduktionsleistung assoziiert sein kann (Sheldon et al. 2006). Als mögliche Ursache des Auftretens einer Metritis werden dabei einerseits peripartale Fehlregulationen sowohl der lokalen und systemischen Immunität als auch Änderungen des Metabolismus diskutiert (Sheldon et al. 2009). Andererseits wird vermutet, dass die Inzidenz einer Entzündung des Uterus in dieser Phase durch körpereigene und auch äußere Stressoren beeinflusst werden kann (Ingvarsten 2006, Mulligan und Doherty 2008). Hierbei können laut Drackley et al. (2005) verschiedene insbesondere haltungsbedingte, aber auch infektiöse, psychosoziale und nahrungsbezogene Stressoren zu einer Beeinflussung des Immunsystems, beispielsweise im Sinne einer Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen, führen. Pryce et al. (2004) heben zudem die postpartal zunehmende metabolische Belastung der Milchkühe als potentiellen Stressor hervor. Laut Ingvarsten (2006) können neben einer metabolischen Dysregulation auch weitere fehlregulierte endokrinologische Abläufe innerhalb des Organismus als Stressoren fungieren, die zu einer nachfolgenden Alteration des immunologischen Status in der peri- und postpartalen Phase führen können. Als Folge ist das Überschreiten der metabolischen und allostatischen Kapazität möglich, welche auch mit einer erhöhten Krankheitsanfälligkeit einhergehen kann (Knight et al. 2001, McEwen und Wingfield 2003, Ingvarsten et al. 2003).

Eine umfassende, objektive Einschätzung dieser zugrunde liegenden Mechanismen einer erhöhten Krankheitsanfälligkeit der Reproduktionsorgane in der postpartalen Phase ist bisher

jedoch nicht abschließend möglich, da unter anderem belastbare Parameter zur Unterscheidung einer möglichen chronischen Stressbelastung von anderweitigen potentiellen endokrinologischen Dysregulationen fehlen. Vor diesem Hintergrund erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Evaluation möglicher Unterschiede der Cortisol-, DHEAS- und DHEA-Konzentrationen bei gesunden und an einer Metritis erkrankten Milchkühen in dem Zeitraum direkt *postpartum* bis drei Wochen *postpartum*.

7.3.1. Untersuchungsgruppen

Die Unterscheidung der beprobten, pluriparen Milchkühe erfolgte anhand der allgemeinen klinischen und speziellen gynäkologischen Untersuchung in eine Gruppe gesunder Kühe *postpartum* sowie in eine Gruppe postpartal an einer Metritis Grad 1 erkrankter Milchkühe (Sheldon et al. 2009). Zur Einschätzung der Aktivität der zellulären Immunantwort wurde bei den untersuchten Milchkühen des Weiteren die Leukozytenzahl bestimmt. Die Ergebnisse der erkrankten Kühe zeigten dabei eine erhebliche Differenz zwischen dem festgestellten niedrigsten und höchsten Leukozytenwert (3.100-10.4000/ μl), so dass zwei weitere Untergruppen gebildet wurden: Metritis mit einer Leukozytenanzahl innerhalb des Referenzbereichs (M_{range} , $5-10 \times 10^6/\mu\text{l}$) und Metritis mit einer Leukopenie (M_{low} , $> 5 \times 10^6/\mu\text{l}$). Eine verminderte Anzahl der Gesamtleukozyten (Leukopenie) kann dabei in der Folge eines erhöhten Verbrauchs oder einer gesteigerten Extravasation im Zuge einer schwerwiegenden lokalen Entzündung, beispielweise des uterinen Gewebes, aber auch bei einer systemischen Infektion beobachtet werden. Des Weiteren kann eine zeitverzögerte Bereitstellung aus dem Knochenmark eine Abnahme der peripheren Leukozytenzahlen verursachen. Hirvonen und Pyörälä (1998) beschreiben in ihrer Arbeit das Vorkommen einer Leukopenie im Zuge einer Akute-Phase-Antwort bei Rindern. Hervorgerufen wird die Leukopenie, den Autoren zufolge, dabei durch eine stressbedingte Abnahme der Lymphozytenzahl wie auch durch die Auswanderung der Neutrophilen Granulozyten in das Entzündungsgebiet (Kidd 1991). So zeigten auch zum Beispiel Milchkühen in einer Publikation von Hopster et al. (1998), die an einer experimentell verursachten Endotoxin-Mastitis erkrankten, einen mit erhöhten Cortisolkonzentrationen korrelierenden Abfall der Lymphozytenzahlen.

In weiteren Studien konnte neben einem Anstieg der Leukozytenzahlen während der Geburt auch ein physiologisch auftretender Abfall der Gesamtzahl der Leukozyten in der ersten Woche *postpartum*, unabhängig vom Gesundheitsstatus, festgestellt werden (Guidry et al. 1976, Mateus et al. 2002, Kim et al. 2005). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Milchkühe waren insgesamt 8.8 ± 0.9 Tage *postpartum*. Die durchgeführte statistische

Auswertung ergab allerdings im Gegensatz zu den Beobachtungen der zuletzt genannten Studien keinen Hinweis darauf, dass die Anzahl der Tage nach der Geburt die festgestellten Leukozytenergebnisse beeinflussten ($P > 0,05$).

Weitere denkbare Einflüsse auf die zelluläre Immunität der erkrankten Milchkühe sowie mögliche Unterschieden der Cortisol-, DHEAS- und DHEA-Konzentrationen zwischen den untersuchten werden daher im Folgenden näher beleuchtet.

7.3.2. Cortisol

Neben einem physiologischen Anstieg der maternalen Cortisolwerte um den Geburtszeitpunkt gilt Cortisol als entscheidender Faktor für das Überleben des Neonaten, das Heranreifen der fetalen Nebennierenachse sowie als geburtauslösendes Signal des Foetus (Patel et al. 1996, Kindahl et al. 2004). Darüber hinaus sind die meisten im Rahmen der Stressreaktion auftretenden Änderungen der Körperabläufe auf die Wirkung von Cortisol als eines der klassischen Stresshormone zurückzuführen (Elenkov und Chrousos 2002, Chrousos 2009). Zudem konnte in Studien gezeigt werden, dass der Umgang mit den Tieren beispielsweise zum Zwecke der Probenentnahme möglicherweise bereits eine akute Stresssituation darstellen kann (Cook et al. 2000). In der hier vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied der Cortisolwerte zwischen den Studiengruppen nachgewiesen werden. Der numerisch höchste Mittelwert von $7,64 \pm 1,84$ ng/ml wurde in der vorliegenden Dissertation in der Gruppe der M_{range} -Kühe festgestellt. In einer Studie von Hopster et al. (1999) zeigten die an die Probenentnahme gewöhnten Milchkühe in zwei aufeinander folgenden Blutprobenentnahme Cortisolmittelwerte von unter 4 ng/ml. Die Autoren schlussfolgerten aufgrund ihres Studienaufbaus, dass es sich bei den gemessenen Cortisolkonzentrationen um Basalwerte handelte. Echternkamp (1984) konnte zudem bei weiblichen Hereford-Kühen, die an die Probenentnahme gewöhnt waren, deutlich geringere Cortisolkonzentrationen ($5,7 \pm 6,5$ ng/ml) nachweisen im Vergleich zu nicht-trainierten Kühen ($66,1 \pm 6,5$ ng/ml). Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss allerdings beachtet werden, dass die Cortisolkonzentrationen in den aufgeführten Studien und in der vorliegenden Arbeit mit unterschiedlichen Messmethoden ermittelt wurden. Zudem erfolgte die Blutprobenentnahme in der vorliegenden Arbeit am Vormittag, wohingegen die Untersuchungen in der Studie Hopster et al. (1999) am Nachmittag durchgeführt wurden. Laut Wagner und Oxenreider (1972) zeigen Kühe jedoch, aufgrund eines zirkadianen Sekretionsrhythmus von Cortisol, morgens physiologisch höhere Cortisolwerte. Vermeintlich niedrigeren Cortisolwerte der trainierten Milchkühe in der Studie von Hopster et al. (1999) könnten somit teils auf die

physiologisch geringeren Konzentrationen am Nachmittag zurückzuführen sein. Ein direkter Vergleich der genannten Studienergebnisse ist daher nicht möglich. Allerdings könnte argumentiert werden, dass die Cortisolwerte der in dieser Dissertation untersuchten Milchkühe womöglich eine vergleichbare Tendenz mit den Ergebnissen der an die Manipulation gewöhnten Kühe aus den Studien von Hopster et al. (1999) und Echternkamp (1984) aufweisen. Hiernach geben die gemessenen Cortisolwerte der Milchkühe in dieser Dissertation, im Gegensatz zu den festgestellten Cortisolkonzentrationen der freilebenden Seehunde, keinen Hinweis auf eine akute Aktivierung des Stresssystems zum Zeitpunkt der Untersuchung. Eine denkbare Gewöhnung der Milchkühe an den menschlichen Umgang und an die Probenentnahme wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht weiter geprüft. Da die beprobten Milchkühe jedoch regelmäßig im Rahmen der Bestandsbetreuung untersucht wurden, könnte dies eine mögliche Erklärung darstellen. Die in der Literatur zur Einschätzung einer chronischen Stresssystemaktivierung vorgeschlagene Feststellung des zeitlichen Verlaufs der Cortisolwertveränderungen (Przekop et al. 1985, Cohen et al. 1997) ist allerdings eine in der Routinediagnostik nicht praktikable Methode. Daher sind weitere Parameter notwendig, um die Beurteilung einer denkbaren chronischen Aktivität des Stresssystems zu ermöglichen und potentielle neuro-immun-endokrinen Interaktionen beurteilen zu können.

7.3.3. DHEA und DHEAS

Die Funktionen und Interaktionen der Steroidhormone DHEA und DHEAS im bovine Organismus sind bisher nur in Ansätzen untersucht. In einer ersten Studie von Marinelli et al. (2007) wurde so zum Beispiel bei einer kleinen Gruppe von Milchkühen durchschnittlich geringere DHEAS-Ergebnisse im Vergleich zu den DHEA-Konzentrationen nachgewiesen. In der vorliegenden Dissertation konnten sowohl bei den Milchkühen als auch bei den Robben einerseits zwischen den jeweiligen Untersuchungsgruppen vergleichbare DHEAS-Werte festgestellt werden. Einen Einfluss des Gesundheitszustandes auf die DHEAS-Werte der untersuchten Milchkühe *postpartum* war somit nicht nachweisbar. Andererseits wiesen die in dieser Dissertation gemessenen DHEAS-Konzentrationen der Milchkühe, wie auch bei den Robben, deutlich höhere Werte auf als die festgestellten DHEA-Konzentrationen. Dieses Ergebnis steht somit im Gegensatz zu den Beobachtungen der Studie von Marinelli et al. (2007). Mögliche Erklärungen hierfür könnten neben den verschiedenen verwendeten Labormethoden, sowohl speziesbedingte als auch zyklusabhängige Unterschiede darstellen. Marinelli et al. (2007) untersuchten Kühe der Rasse Italian Friesian, welche mindestens 55 Tage *postpartum* waren. In dieser Dissertation hingegen wurden Milchkühe der Rasse

Holstein Friesian beprobt, die sich im Zeitraum 8.8 ± 0.9 Tage *postpartum* befanden. Eine mögliche speziesbedingte Varianz wurde beispielsweise auch von Buckham-Sporer et al. (2008a) für die DHEA-Konzentrationen bei Bullen beschrieben. In verschiedenen, vor allem humanmedizinischen Studien zeigte DHEAS, als Zwischenprodukt der Sexualhormonsynthese, zudem eine zyklusbedingte Beeinflussung. Cumming et al. (1982) konnten so beispielsweise Hinweise dafür finden, dass eine ovarielle Dysfunktion sowie eine Ovarioektomie bei Menschen in jungen Lebensjahren zu einem Abfall der DHEAS-Werte führte, wie sie auch bei Frauen in der Postmenopause zu finden ist. Während der Schwangerschaft kommt es, einer Studie von McLean und Smith (2001) beim Menschen zufolge, darüber hinaus zu einer zusätzlichen Produktion von DHEA und DHEAS durch die fetale Nebenniere. Die Sekretion von DHEA und DHEAS erfolgt dabei vermutlich in der Folge der plazentaren Ausschüttung des Corticotropin-releasing Hormons (Smith et al. 1998). Das hierauf aus der fetalen Zone abgegebene DHEA und DHEAS fungiert dabei als Hauptprodukt der Östrogenbildung in der Plazenta (Challis und Olson 1988). Möstl et al. (1989) konnten auch bei trächtigen Kühen ein Anstieg der DHEA-Konzentrationen einige Tage vor der Geburt feststellen. Nach Abgang der Plazenta wurden hingegen geringere DHEA-Werte nachgewiesen, so dass ebenfalls eine plazentare DHEA-Synthese im peripartalen Zeitraum von den Autoren angenommen wurde.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei insgesamt sechs Kühen ein Progesteronwert über 1 ng/ml gemessen werden, welcher auf einen sezernierenden Gelbkörper schließen lässt (Ott et al. 1986). Allerdings zeigten diese Tiere keinen signifikanten Unterschied der DHEA- oder DHEAS-Konzentrationen im Vergleich zu den Milchkühen ohne Gelbkörper, so dass ein luteale Ausschüttung von DHEA und DHEAS zum Untersuchungszeitpunkt nicht zu vermuten ist. Die genaue Funktion wie auch mögliche Interaktionen von DHEAS im bovinen Organismus bleiben somit vorerst unklar. Eine Abnahme der DHEAS-Werte im Verlauf des weiteren Zyklus, die womöglich zu niedrigeren DHEAS-Werte bei den von Marinelli et al. (2007) untersuchten Kühen geführt haben könnte, wäre allerdings denkbar. In weiteren Untersuchungen sollten daher die Verhältnisse sowohl im Verlauf des Zyklus als auch vor, während und nach der Geburt bei einer größeren Tiergruppe näher beleuchtet werden.

In zwei weiteren Untersuchungen zum Einfluss des Transports auf die Stressbelastung von Jungbullen unterschiedlicher Fleischrinderrassen konnte Buckham-Sporer et al. (2008a, 2008b) im Gegensatz zu den Ergebnissen der Studie von Marinelli et al. (2007) eine deutliche negative Korrelation der Cortisol- und DHEA-Konzentrationen aufzeigen. Dies konnte auch

in humanmedizinischen Studien (Parker et al. 1985, Guilliams und Edwards 2010) und in der Gruppe der freilebenden, erkrankten Seehunde beobachtet werden. Die beprobten Bullen wiesen hierbei zeitgleich mit dem festgestellten Cortisolhöchstwert einen signifikanten Abfall der DHEA-Werte und einen deutlichen Anstieg des Cortisol/DHEA-Quotienten auf (Buckham-Sporer et al. 2008a, 2008b). Marinelli et al. (2007) schlussfolgerten in ihrer Studie hingegen, dass ACTH als Stimulanz der adrenalen Freisetzung von DHEA womöglich bei Milchkühen nur eine geringe Bedeutung zufällt. Jedoch ist es auch möglich, dass der von Marinelli et al. (2007) verwendete Labortest nicht sensitiv genug war, um potentielle Unterschiede in den einzelnen Proben widerzuspiegeln. So konnten die Autoren nämlich nach Beendigung eines Langzeit-ACTH-Stimulationstest signifikant höhere DHEA-Mittelwerte ($P < 0,05$) beobachten. Eine mögliche Erklärung hierfür wurde von den Autoren der Studie allerdings nicht weiter diskutiert. Denkbar wäre eine metabolische Verschiebung, die womöglich mit einer nicht detektierten geringgradigen Abnahme der DHEA- und der Zunahme der Glukokortikoidproduktion während der simulierten länger anhaltenden Stresssituation (Parker et al. 1985) in Folge der Langzeit-ACTH-Gabe einherging und eine mögliche Rückkehr zu Basalwerten nach Beendigung der ACTH-Applikation. Für eine genauere Abklärung wären allerdings weitere Untersuchungen notwendig.

Almeida et al. (2008) konnte in einer Untersuchung von Milchkühen, die an einer entzündlichen Klauenerkrankung litten, im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe ebenfalls statistisch signifikant niedrigere DHEA-Konzentrationen sowie einen höheren Cortisol/DHEA-Quotienten feststellen. Den Autoren zufolge könnten die niedrigeren DHEA-Konzentrationen dabei einen Hinweis auf die Chronizität der Erkrankung darstellen. Zudem könnte eine Reduktion der immunprotektiven Wirksamkeit von DHEA bei den erkrankten Milchkühen zu einer weiteren Progression der Gewebeschädigung geführt haben. Die genauen, grundlegenden Mechanismen konnten in dieser Arbeit jedoch nicht abschließend geklärt werden und scheinen auf Grundlage der Datenlage der Studie eher spekulativ. Allerdings wiesen auch Buckham-Sporer et al. (2008b) eine Korrelation zwischen dem Cortisol/DHEA-Quotienten und der Genexpression inflammatorischer Immunbotenstoffe in der Folge des Transports nach. Die Autoren schlussfolgerten ebenfalls, dass die festgestellten Ergebnisse auf eine Zunahme des „proinflammatorischen Potenzials“ im Zuge des Transportstress hinweisen.

Die an einer Metritis erkrankten, leukopenischen Kühe in der vorliegenden Dissertation zeigten im Gegensatz zu den Erkenntnissen der genannten Studien (Almeida et al. 2008,

Buckham-Sporer et al. 2008a, 2008b) deutlich höhere DHEA-Konzentrationen im Vergleich zu der Gruppe der gesunden Milchkühe.

In der Folge einer mikrobiellen Infektion, hier beispielweise des Uterus, kommt es zu einer Aktivierung der zellulären Immunantwort (Janeway und Medzhitov 2002). Proinflammatorische Mediatoren werden dabei von beteiligten Immunzellen sezerniert. Im Rahmen der von Watkins und Maier (1999) als „immune-to-brain communication“ bezeichneten Interaktion übermitteln diese Mediatoren die Informationen aus der Peripherie zum Hypothalamus. Die Aktivierung des Hypothalamus führt dabei im Sinne einer antiinflammatorischen Reaktion über die HPA-Achse zu einer Ausschüttung von Cortisol und DHEA aus der Nebennierenrinde (Besedovsky et al. 1991, Jessop 1999). Cortisol weist hierbei jedoch eher immunsuppressive Eigenschaften auf, wohingegen für DHEA immunprotektive Wirkungen nachgewiesen wurden (Hazeldine et al. 2010). Als Beispiele für die immunsuppressiven Wirkungen von Cortisol gelten neben der bereits erwähnten Abnahme der Lymphozyten und der Steigerung der Neutrophilenanzahl, die Unterdrückung proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-2, Interleukin-6 oder des Tumornekrosefaktors (Dhabhar et al. 1995, Chrousos 2009). Im Gegensatz dazu konnten Daynes et al. (1990) eine Steigerung der Bildung von Interleukin-2 in murinen Lymphozyten und Suzuki et al. (1991) in humanen CD4⁺-T-Zellen in der Folge einer DHEA-Applikation nachweisen. Darüber hinaus stellten Barkhausen et al. (2006) in einer in-vitro Studie einen immunmodulatorischen Einfluss von DHEA auf die Expression verschiedener an der Extravasation der Leukozyten beteiligten Adhäsionsmoleküle fest. Hierbei führte DHEA im Rahmen einer induzierten Endotoxin-Sepsis zu einer Steigerung der Expression von L-Selektin, wohingegen die Expression des Intrazellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) wie auch der Integrine CD11b und CD18 zu unterschiedlichen Versuchszeitpunkten herunterreguliert wurden. L-Selektine spielen eine wichtige Rolle als Vermittler der lockeren Zellverbindung während des „rollings“ der Leukozyten an der Endothelwand zu Beginn der Leukodiapedese (Arbonés et al. 1994, Nicholson et al. 1998). ICAM-1 wie auch die Integrine CD11b und CD18 regulieren hingegen die später einsetzende feste Anheftung der Leukozyten an die Endothelzellen (Lynam et al. 1998). Barkhausen et al. (2006) schlussfolgerten, dass diese immunmodulatorischen Effekte von DHEA wahrscheinlich eine Gegenregulation der Endotoxin-vermittelten Wirkungen auf die Leukozyten darstellten. Die in der vorliegenden Arbeit festgestellte erhöhte DHEA-Konzentration der leukopenischen Metritis-Kühe könnte so womöglich ebenfalls auf eine Zunahme der gegenregulatorischen, immunmodulatorischen Effekte von DHEA auf die Leukozytenadhäsionsmoleküle hindeuten. Ein möglicher Einfluss

auf die verschiedenen Mediatoren der zellulären Immunantwort wurde in der vorliegenden Studie jedoch nicht näher untersucht. Allerdings wird die Hypothese der gesteigerten immunmodulatorischen und immunprotektiven Wirkungen von DHEA bei den leukopenischen Metritis-Kühen, neben dem niedrigen errechneten Stressindex dieser Untersuchungsgruppe, auch durch eine weitere humanmedizinische Untersuchung von Sanning (2010) gestützt. In dieser Studie wiesen die Sepsispatienten, im Vergleich zu gesunden Patienten und solchen mit einem akuten Hüfttrauma, die höchsten DHEA-Konzentrationen auf. Sanning (2010) deutete diese im Vergleich gesteigerte DHEA-Produktion ebenso als eine hormonelle Gegenregulation mit dem möglichen Ziel das Gleichgewicht zwischen der immunsupprimierenden Wirkung des Cortisols und der immunprotektiven Effekte von DHEA zu erhalten.

In verschiedenen Studien beim Menschen und bei verschiedenen Tierarten wurde zur besseren Darstellung der Verhältnisse zusätzlich der Cortisol/DHEA-Quotient berechnet (Buckham-Sporer et al. 2008b, Newman et al. 2008, Sanning 2010). Dieser Quotient gilt dabei unter anderem als prognostisches Hilfsinstrument für die Einschätzung des Verlaufs und des Schweregrads einer Erkrankung (Marx et al. 2003, Butcher et al. 2005). Die Untersuchung von Sanning (2010) zeigte beispielsweise, dass Patienten mit schwerer Sepsis und Patienten, die im Verlauf der Sepsis verstarben einen höheren Cortisol/DHEA-Quotienten aufwiesen als eine gesunde Kontrollgruppe. Ein höherer Cortisol/DHEA-Quotient korrelierte positiv mit dem Schweregrad der Sepsis und schien mit einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein (Sanning 2010). In dieser Dissertation zeigten die leukopenischen Metritis-Kühe hingegen den niedrigsten Cortisol/DHEA-Quotienten. Kritisch zu sehen ist, dass in der vorliegenden orientierenden Arbeit keine Daten zu dem weiteren Krankheitsverlauf der an einer Metritis erkrankten Milchkühe erhoben wurden. Daher ist bei den leukopenischen Milchkühen keine vergleichende prognostische Aussage über eine mögliche Korrelation des festgestellten Cortisol/DHEA-Quotienten und einer vorstellbaren Rekonvaleszenz möglich. Die Übertragbarkeit dieser Erkenntnisse aus der Studie von Sanning (2010) müsste daher in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

In der vorliegenden Dissertation zeigten die leukopenischen Metritis-Kühe zudem einen höheren DHEA/DHEAS-Quotienten verglichen mit den gesunden Milchkühen ($P < 0,05$). Eine mögliche Erklärung könnte eine bei Menschen festgestellt Dissoziation der DHEA- und DHEAS-Konzentrationen unter septischen Bedingungen darstellen (Kim et al. 2004, Arlt et

al. 2006, Sanning 2010). Grundlegend ist hierbei vermutlich eine Inhibition der für die Sulfatierung von DHEA notwendigen Hydroxysteroid Sulfontransferase 2A1 (SULT2A1) im Rahmen der Sepsis (Kim et al. 2004, Saning 2010). Kim et al. (2004) zeigten so in einem Mausmodell eine Reduktion der SULT2A1-Aktivität während einer induzierten Akute-Phase-Reaktion, die zu einer Abnahme der DHEAS-Konzentrationen führte.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Zunahme der DHEA-Konzentration in den untersuchten leukopenischen Metritis-Kühen eher eine endokrine Gegenregulation im Zusammenhang mit der Entzündung zu sein scheint. Die höheren Werte könnten dabei auf die immunmodulatorische und –protektive Wirkungen von DHEA hindeuten. Hinweise auf eine mögliche chronische Stressbelastung lassen sich anhand der ausgewählten Untersuchungsgruppen hingegen weniger vermuten. Daher muss auch die Eignung und Auswahl der untersuchten Milchkühe zur Feststellung einer unterschiedlichen Stresssystembelastung in dieser Dissertation kritisch hinterfragt werden. Zur Evaluation der Einsatzmöglichkeit von DHEA und DHEAS als Parameter für die Einschätzung einer Stresssystemaktivierung im bovinen Organismus wäre möglicherweise die Untersuchung einer klinisch gesunden Tiergruppe, die einem definierten Stressor unter konstanten Bedingungen ausgesetzt wird, verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe zielführender. Die Erstellung eines Verlaufspröfils der Cortisol- und DHEA-Konzentrationen vor und nach einem definierten Stressor könnte hierbei in zukünftigen Forschungsarbeiten helfen die Begebenheiten beim Rind weiter abzuklären.

7.4. Gesamteinschätzung der Untersuchungsergebnisse

Bei der Einschätzung eines möglichen Einflusses des Stresssystems muss beachtet werden, dass die Analyse eines einzelnen Parameters nur einen Teil dieser neuro–immun–endokrinen Interaktionen im Rahmen einer Stressantwort widerspiegelt (Haddad et al. 2002). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass die alleinige Messung von Cortisol keine verlässliche Methode bei den untersuchten Robben oder den Rindern darstellte, um mögliche Unterschiede in der Aktivierung des Stresssystems zwischen den Untersuchungsgruppen abzubilden.

Die Ergebnisse der DHEA-Analysen bei den erkrankten, wildlebenden Robben stimmten mit Beobachtungen in der Humanmedizin überein (Guilliams und Edwards 2010). Basierend auf den von Haddad et al. (2002) und Borghetti et al. (2009) erwähnten bidirektionalen neuro–immun–endokrinen Interaktionen, könnte das erhöhte Verhältnis von Cortisol zu DHEA der

erkrankten, wildlebenden Seehunde somit möglicherweise auf eine stress-induzierte Alteration des Immunsystems hinweisen. Der Cortisol/DHEA-Quotient könnte in Zukunft helfen den Einfluss des Stresssystems auf verschiedene Krankheitsverläufe, zum Beispiel vergleichend zwischen erkrankten Neuzugängen und rehabilitierten Heulern in einer Auffangstation, objektiv darzustellen. Zudem wäre auch ein weiterer Einsatz zur belastbaren Einschätzung der Stressreaktion in der Folge eines regelmäßigen Mensch-Tier-Kontakts bei in menschlicher Obhut lebenden Robben denkbar.

Die in dieser vorliegenden Arbeit untersuchten Kühe, welche an einer Metritis erkrankt waren und zudem eine Leukopenie aufwiesen, zeigten entgegen der Hypothese höhere DHEA-Konzentrationen wie auch einen geringeren Cortisol/DHEA-Quotienten als möglichen Hinweis auf die immunmodulatorische und –protektive Wirksamkeit von DHEA. Es ist denkbar, dass die Unterschiede des Gesundheitszustands zwischen den gesunden und an einer Metritis erkrankten Milchkühe Grad I (Sheldon et al. 2009) nicht alleine auf eine Alteration durch das Stresssystems zurückzuführen sind. So argumentieren Sheldon et al. (2006), dass die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer uterinen Erkrankung in der Folge einer postpartalen bakteriellen Kontamination zu gleichen Teilen abhängig von der Immunantwort wie auch dem endokrinen Status sei. Den Autoren zufolge können sowohl die immunsupprimierenden Wirkung von Progesteron und auch der adrenalen Steroide, wie Cortisol, gleichermaßen an der Entstehung und dem weiteren Vorschreiten einer Entzündung des Uterusgewebes beteiligt sein. Eine chronische Stressbelastung stellt aufgrund der vielseitigen neuro–immun–endokrinen Wechselbeziehungen somit vermutlich nur eine Möglichkeit der negativen Beeinflussung des Gesundheitsstatus in der Transitperiode dar. Die zeitgleiche Analyse verschiedener metabolischer, immunologischer und Stressindikatoren scheint daher sinnvoll.

Zur Feststellung des Einflusses eines mangelnden Ernährungszustandes bei den Robben beziehungsweise einer negativen Energiebilanz bei den postpartalen Milchkühen wurde die Konzentrationen des Polypeptids Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I (IGF-I) in den untersuchten Tieren analysiert. Hierbei kann eine Alteration des Stoffwechsels im Sinne einer negativen Energiebilanz als negativer Faktor und auch als zusätzlicher Stressor fungieren (Zulu et al. 2002). Die erkrankten, wildlebenden Seehunde wiesen im Vergleich zu den gesunden Robben deutlich niedrigere IGF-I-Werte auf. Da bei diesen Tieren auch ein schlechter Ernährungszustand festgestellt werden konnte, ist der Abfall der IGF-I-Konzentration als Hinweis für eine negative Energiebilanz zu deuten. Bei den untersuchten

Milchkühen wurden hingegen, unabhängig von dem Gesundheitsstatus, neben vergleichbaren stabilen Ergebnissen der Body-Condition-Scores, keine Unterschiede zwischen den IGF-I-Werten der drei Untersuchungsgruppen festgestellt. Somit ist davon auszugehen, dass kein signifikanter negativer Einfluss der Energiebilanz auf das Auftreten einer Erkrankung des Reproduktionstraktes zum Zeitpunkt der Untersuchung vorlag.

IGF-I wurde bereits sowohl bei verschiedenen Robbenarten als auch bei Milchkühen zur Beurteilung der Ernährungszustands angewendet (Zulu et al. 2002, Butler et al. 2003, Ortiz et al. 2003, du Dot et al. 2009). Auch die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit unterstützen die Verwendung von IGF-I als metabolischer Indikator für die Energiebilanz.

7.4.1. Entwicklung und Validierung eines Belastungsindex

Im Verlaufe dieser Arbeit sollten die untersuchten Parameter ebenfalls auf ihre Einsatzfähigkeit als Bestandteil eines Belastungsindex getestet werden. Dieser sollte dabei helfen die Beanspruchung des Stresssystems objektiv und zwischen den Tierarten vergleichbar darzustellen. Die in dieser Dissertation ausgewählten und untersuchten Tiergruppen zeigten allerdings nur vereinzelt Hinweise einer vermehrten Stresssystemaktivierung, so dass keine abschließenden, belastbaren Aussagen über die Stressbelastung, insbesondere im zwischenartlichen Vergleich, getroffen werden können. So scheint zwar das Steroidhormon DHEA als ein belastbarer Parameter für eine mögliche chronische Aktivierung des Stresssystems bei Robben zu fungieren. Auch konnte anhand des Cortisol/DHEA-Quotients eine Beurteilung der Aktivität und Funktion der HPA-Achse bei den untersuchten Robben erfolgen. Die Ergebnisse der Untersuchungen bei den Milchkühen deuteten hingegen daraufhin, dass der Anstieg der DHEA-Konzentrationen in den leukopenischen und an einer Metritis erkrankten Kühen eher als ein immunmodulatorisches Signal zu deuten ist. Jedoch könnte der Quotient hier möglicherweise, aufgrund der Interaktionen des neuroendokrinen und immunologischen Systems, als prognostisches Hilfsmittel für die Einschätzung des Verlaufs und des Schweregrads einer Erkrankung eingesetzt werden.

Aufgrund dieser Heterogenität der Wirkungen von DHEA in den untersuchten Tierarten, erscheint die Anwendung in einem speziesübergreifenden Belastungsindex daher nicht ausreichend validiert, um das Ausmaß einer Beanspruchung des Stresssystems abzubilden. Der Cortisol/DHEA-Quotient stellt jedoch einen vielversprechenden Hilfsparameter zur objektiveren Einschätzung einer möglichen Fehlregulation sowie des Einflusses der HPA-

Übergreifende Diskussion

Achse auf die Funktion des neuro–immun–endokrinen Netzwerks innerhalb einer Tierspezies dar.

8. Zusammenfassung

Neele Hendrika Gundlach

Untersuchung zur Stressbelastung von Robben (*Pinnipedia*) und Rindern: Entwicklung und Validierung eines Belastungsindex

Eine länger anhaltende oder in kurzen Abständen wiederkehrende Stresssituation kann zu einer chronischen Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-(HPA) Achse führen. Eine solche chronische Belastung, zum Beispiel durch umweltbezogene, haltungsbedingte oder anthropogene Stressoren, kann dabei neben einer fehlgeleiteten Stressantwort auch eine Überbelastung der Adaptationsmechanismen nach sich ziehen. Neben physiologischen können so auch pathologische Veränderungen im Rahmen einer chronischen Stressantwort auftreten, die aufgrund der Interaktionen des neuroendokrinen und immunologischen Systems außerdem mit einer erhöhten Krankheitsanfälligkeit assoziiert sein können (Besedovsky und Rey 1996, McEwen und Wingfield 2003). Traditionell wird die Bestimmung von Cortisol in Blutproben als häufigste Messmethode zur Evaluation der Stressauswirkung verwendet. Hierbei kann allerdings bereits die Manipulation zum Zweck einer Probenentnahme, gerade bei marinen Wildtieren oder auch landwirtschaftlichen Nutztieren, zu einem akuten Anstieg der Cortisolwerte führen (Mormède et al. 2007, Sheriff et al. 2011). In der Humanmedizin gewinnt zunehmend die Analyse des Steroidhormons Dehydroepiandrosteron (DHEA) zur besseren Unterscheidung einer akuten von einer chronischen Stresssystemaktivierung an Bedeutung. Während einer länger anhaltenden Stresssystemaktivierung kann hierbei, aufgrund des gemeinsamen Bildungswegs von DHEA und Cortisol aus dem Vorläuferhormon Pregnenolon, neben einer Steigerung der Cortisolkonzentrationen auch eine zeitgleiche Abnahme der DHEA-Werte beobachtet werden (Parker et al. 1985, Guilliams und Edwards 2010).

In der vorliegenden Dissertation wurden daher mögliche Unterschiede der Cortisol-, DHEA- und DHEAS-Konzentrationen zwischen unterschiedlichen Untersuchungsgruppen bei zwei verschiedenen Tierspezies, Robben und Milchkühen, evaluiert. Ziel war es diese Parameter bei erkrankten Robben und Milchkühe zu messen und somit gegebenenfalls Rückschlüsse auf eine zuvor stattgefunde chronische Stresssystemaktivierung mittels der Cortisol-, DHEA- und DHEAS-Konzentrationen und auch des Cortisol/DHEA-Quotienten ziehen zu können.

Darüber hinaus sollte der Einsatz dieser Parameter als Bestandteil eines spezieübergreifenden Belastungsindex, zur Einschätzung des Einflusses einer chronischen Stressbelastung auf den Organismus, evaluiert werden.

Im ersten Hauptteil der vorliegenden Arbeit wurden dazu zwei unterschiedliche wild- und in menschlicher Obhut lebende Robbenarten beprobt. In einer ersten Studie erfolgte die Beurteilung des Einsatzes von Tränenflüssigkeit und Speichel als alternative, situationsunabhängige Untersuchungsmaterialien zur Cortisolbestimmung bei freilebenden Seehunden und an den menschlichen Umgang habituierten Robben. Hierbei sollte geprüft werden ob ein bereits bei Menschen und auch bei Rindern festgestellter zeitverzögerter Anstieg der Cortisolkonzentrationen im Speichel und der Tränenflüssigkeit (Banbury 2009, Khraim 2011, Hernandez et al. 2014) ebenfalls bei den untersuchten Robben nachgewiesen werden kann. Die Untersuchungen ergaben dabei eine deutliche Korrelation zwischen den Cortisolkonzentrationen im Serum und der Tränenflüssigkeit ($R^2=0.82$, $P < 0.01$) wie auch eine belastbare Korrelation zwischen den Speichel- und Tränenflüssigkeitsergebnissen ($R^2=0.68$, $P < 0.05$) sowie zwischen den Speichel- und Serumwerten ($R^2=0.60$, $P < 0.05$) der freilebenden Seehunde. Aufgrund der deutlichen Korrelation der Cortisolwerte im Serum und in der Tränenflüssigkeit scheint letztere ebenfalls die durch die Probenentnahme beeinflusste Cortisolkonzentration abzubilden, so dass die Entnahme von Tränenflüssigkeit demnach keine situationsunabhängige Alternative zur Blutprobenentnahme darzustellen scheint. Hingegen könnte die moderate Korrelation der Speichel- und Serumcortisolwerte auf den bei anderen Tierarten nachgewiesenen zeitverzögerten Anstieg der Cortisolwerte hinweisen. Die Speichelprobenentnahme könnte somit eine neue Möglichkeit zur Feststellung der eigentlichen, von der Manipulation unbeeinflussten Stressreaktion bei Robben widerspiegeln.

Im zweiten Hauptteil erfolgte die Beurteilung möglicher Unterschiede der Cortisol-, DHEAS- und DHEA-Konzentrationen zunächst bei an den menschlichen Umgang habituierten sowie bei gesunden und erkrankten freilebenden Robben. Hierbei wurde hypothetisch angenommen, dass die in menschlicher Obhut lebenden Robben keiner, die freilebenden gesunden Seehunde durch die Probenentnahme hingegen einer akuten Stressbelastung und die Gruppe der freilebenden erkrankten Seehunde einer chronischen Stresssystemaktivierung ausgesetzt waren. Neben der Einschätzung des Gesundheitszustands anhand einer allgemeinen beziehungsweise postmortalen Untersuchung erfolgte die Bestimmung eines kleinen Blutbildes, sowie die Analyse von Cortisol, DHEAS und DHEA aus den gewonnenen

Blutproben. Die habituierten Robben zeigten hierbei deutlich geringere Cortisolwerte ($P < 0,01$) verglichen mit beiden Wildtiergruppen, wohingegen die Konzentrationen zwischen den gesunden und erkrankten Wildtieren vergleichbar waren. Zudem konnte kein signifikanter Unterschied der DHEAS-Werte zwischen den untersuchten Gruppen nachgewiesen werden. Allerdings wiesen die erkrankten, wildlebenden Seehunde numerisch niedrigere DHEA-Konzentrationen sowohl im Vergleich zu den habituierten als auch signifikant niedrigere Werte verglichen mit den gesunden, wildlebenden Robben ($P < 0,05$) auf. Außerdem konnte ein deutlich höherer Cortisol/DHEA-Quotient der erkrankten Wildtiere im Vergleich zu den habituierten Robben festgestellt werden ($P < 0,001$). Auch der aus dem Ernährungszustand und den Cortisolwerten im Bezug zu den DHEA- und IGF-I-Konzentrationen errechneten Stressindex ergab den höchsten Wert in der Gruppe der erkrankten, freilebenden Seehunde. Es könnte somit spekuliert werden, dass entweder eine möglicherweise chronische Stresssystembelastung zu einer Beeinflussung des Gesundheitszustands der erkrankten, freilebenden Seehunde geführt haben könnte oder aber der schlechte Gesundheitszustand selbst als ein zusätzlicher Stressor fungierte. Das Steroidhormon DHEA wie auch das Verhältnis von Cortisol und DHEA scheinen somit ein verlässliches Hilfsmittel für die Einschätzung einer chronischen Aktivierung des Stresssystems bei Seehunden und Kegelrobben darzustellen.

Unter der Annahme, dass eine chronische Stressbelastung zu einer höheren Inzidenz von entzündlichen Produktionserkrankungen in der postpartalen Phase führen kann (Ingvarsten 2006, Mulligan und Doherty 2008), wurde erstmals mögliche Unterschiede der Cortisol-, DHEA- und DHEAS-Konzentrationen vergleichend bei gesunden und an einer Metritis erkrankten Milchkühen *postpartum* analysiert. Hierzu wurden neben der Durchführung einer allgemeinen und speziellen gynäkologischen Untersuchung ebenfalls Blutproben von den gesunden und an einer Metritis erkrankten Kühe entnommen. Neben den endokrinologischen Analysen von Cortisol, DHEAS und DHEA erfolgte die Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl zur Beurteilung der Aktivität der zellulären Immunantwort der untersuchten Milchkühe. Anhand der festgestellten Leukozytenzahlen wurden die erkrankten Milchkühe in zwei weitere Untergruppen eingeteilt: Metritis mit einer Leukozytenzahl innerhalb des Referenzbereich oder Metritis mit einer Leukopenie. Die Cortisol- wie auch die DHEAS-Werte waren vergleichbar zwischen den drei Untersuchungsgruppen. Allerdings wiesen die erkrankten, leukopenischen Milchkühen höhere DHEA-Konzentrationen im Vergleich zu den gesunden Kühen ($P < 0,05$) auf. Des Weiteren konnte bei den erkrankten,

leukopenischen Kühen der niedrigste Cortisol/DHEA-Quotient festgestellt werden. Hieraus konnte geschlussfolgert werden, dass die höheren DHEA-Konzentrationen bei den erkrankten, leukopenischen Milchkühen eher einen endokrinen gegenregulatorischen Prozess, im Zuge der in der Literatur beschriebenen immunmodulatorischen und –protektiven Wirksamkeit von DHEA widerspiegeln könnten. Diese Schlussfolgerung wird auch durch den niedrigen Stressindex der erkrankten, leukopenischen Milchkühe, welcher aus dem BCS, dem Verhältnis der Cortisol- und DHEA-Konzentrationen zueinander sowie dem metabolischen Marker IGF-I berechnet wurde, untermauert. Der Cortisol/DHEA-Quotient könnte, aufgrund der vermeintlich antagonistischen Wirkung dieser beiden adrenalen Hormone auf das Immunsystem, in zukünftigen Studien als prognostisches Hilfsmittel für die Einschätzung des Verlaufs einer Erkrankung verwendet und sollte in weiteren Arbeiten verfolgt werden.

In Rahmen dieser Arbeit konnten Hinweise für die unterschiedlichen Eigenschaften sowie Interaktionen des Steroidhormones DHEA mit dem Stress- und Immunsystem bei zwei verschiedenen Säugetierarten gefunden werden. Aufgrund dieser bei den untersuchten Tierarten festgestellten divergierenden Wirkungen von DHEA scheint allerdings die Etablierung eines speziesübergreifenden Belastungsindex aus den erhobenen Daten nicht geeignet für eine verlässliche Einschätzung einer chronischen Stressbelastung. Allerdings könnte der Cortisol/DHEA-Quotient bei den untersuchten Tierarten helfen eine mögliche Fehlregulation, wie auch den Einfluss der HPA-Achse auf die Funktion des neuro-immun-endokrinen Netzwerks objektiv und belastbar abzubilden.

9. Summary

Neele Hendrika Gundlach

Investigations of stress in different mammals - pinnipeds (harbor and gray seals) and cattle

A prolonged or rapidly recurring stress exposure may lead to a chronic activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal-(HPA) axis. Such a chronic stress exposure, for example due to environmental or anthropogenic stressors, may result in a misguided stress response as well as an overload of the adaptive mechanisms. As a consequence, physiological and also pathological changes may occur, which can also be associated with an increased susceptibility to disease (Besedovsky und Rey 1996, McEwen und Wingfield 2003). Determination of cortisol is considered to be the traditional method of choice to assess a stress exposure. However, levels of cortisol might be influenced by handling while gaining samples, especially in marine wildlife and livestock animals (Cook et al. 2000, Mormède et al. 2007). Thus, in human medicine the assessment of the steroid hormone dehydroepiandrosterone (DHEA) has become more and more important to differentiate between an acute and chronic stress response. It could be shown that a chronic hyperresponsiveness of the HPA-axis causes on the one hand a decrease of the DHEA concentrations, whereas an increased production of cortisol from the common precursor hormone pregnenolone occurs (Parker et al. 1985, Guilliams and Edwards 2010).

Therefore, possible differences regarding the cortisol-, DHEA- and DHEAS- concentrations were assessed in two different mammalian species in the present study. The aim was to measure the cortisol-, DHEA-, DHEAS-concentrations as well as the cortisol/DHEA-ratio in diseased seals and dairy cows in order to assess a potentially occurring chronic activations of the stress system. Moreover, these parameters were evaluated as part of a multi-species stress index for the evaluation of the impact of a chronic stress exposure on the organism.

In the first part of this study, cortisol was determined in lachrymal fluid and saliva as alternative sampling materials in wild seals as well as seals being habituated to human

handling. In earlier studies in humans and cattle the use of saliva and lachrymal fluid was already evaluated as a possible alternative sampling material (Banbury 2009, Khraim 2011, Hernandez et al. 2014). According to these studies the rise of cortisol shows a time lag in saliva respectively lachrymal fluid compared to serum. Therefore it was tested whether similar conditions can also be found in harbor and gray seals. Regression analyses revealed a reliable correlation between serum cortisol and the cortisol concentration in lachrymal fluid ($R^2=0.82$, $P < 0.01$), whereas concentrations in saliva and tears ($R^2=0.68$, $P < 0.05$) as well as between saliva and serum ($R^2=0.60$, $P < 0.05$) displayed moderate correlations. Based on these findings cortisol concentrations in lachrymal fluid may rather represent increased cortisol values influenced by restraint and handling. However, the moderate correlation between saliva and serum cortisol concentrations may indicate a time-delayed increase of cortisol in the saliva samples of these pinnipeds. Thus, sampling of saliva may present a situation independent alternative for the assessment of cortisol in different seal species.

In the second part of the present study, possible differences of the cortisol-, DHEAS- and DHEA-concentrations were examined in seals living in human care as well as healthy and diseased, free-ranging seals. This investigation was based upon the hypothesis that habituated seals do not experience stress due to the sampling procedure in contrast to healthy, free-ranging seals. Moreover, it was assumed that diseased, free-ranging seals were exposed to chronic stress before the sampling took place. At the beginning, the health status was assessed based on a general respectively *postmortem* examination and the determination of blood cell counts. In addition, cortisol-, DHEAS- and DHEA-concentrations were analyzed. The habituated seals showed significantly lower cortisol levels ($P < 0.01$) compared to both free-ranging seal groups. However, cortisol concentrations of the healthy free-ranging seals were similar to those of the diseased, free-ranging harbor seals. The DHEAS values were also similar between the three study groups. The free-ranging, diseased harbor seals showed the lowest DHEA concentrations compared to the healthy, free-ranging seal group ($P < 0.05$). In addition, the diseased, free-ranging seals displayed a higher cortisol/DHEA-ratio compared to the habituated seals ($P < 0.001$). Also regarding the calculated stress index, based on the relationship between the nutritional status and cortisol values compared to the DHEA- and IGF-I-concentrations, the group of the diseased, free-ranging harbor seals revealed the highest

value. It may therefore either be assumed that a chronic stress exposure may possibly have influenced the health status of the diseased, free-ranging seals or that the poor health status may have triggered a stress response itself. However, the steroid hormone DHEA and the cortisol/DHEA-ratio seem to represent reliable tools for the assessment of a chronic stress response in harbor and gray seal.

Based on the assumption that a chronic stress exposure causes a higher incidence of inflammatory reproduction diseases in the postpartal period (Ingvarsten 2006, Mulligan und Doherty 2008) differences of the cortisol-, DHEAS- and DHEA-concentrations were analyzed comparing healthy cows and those suffering from a postpartal metritis. For this purpose each cow had to undergo a clinical and gynecological examination of the uterus and ovaries as well as the evaluation of possible vaginal discharge. Furthermore, blood samples were gained for endocrinological analyses. Also a determination of leukocyte number was conducted in order to assess the activity of the cellular immunity. According to the results of leukocyte counts the examined cows were subcategorized as healthy, suffering from metritis with normal number of leukocytes ($M_{\text{range}}, 5-10 \times 10^6/\mu\text{l}$) or with leucopenia ($M_{\text{low}}, < 5 \times 10^6/\mu\text{l}$).

As a result, concentrations of cortisol and DHEAS could be compared between the three study groups. Nevertheless, leucopenic cows suffering from metritis showed higher DHEA concentrations than the healthy cows ($P < 0.05$). Furthermore, the leucopenic, diseased cows revealed the lowest cortisol/DHEA-ratio. It can therefore be speculated that the higher DHEA values of the M_{low} cows may possibly reflect the immunomodulatory and -protective characteristics of DHEA which has been described in the literature. Higher DHEA concentrations may therefore function as a hormonal counter regulation in order to maintain a balance between the opposite effects of cortisol and DHEA on the immune system. This conclusion is also supported by the low stress index of the leucopenic, diseased cows calculated from the relationship between the body condition score and cortisol concentrations compared to the DHEA- and IGF-I- values. Based on the potential antagonizing effects of the assessed adrenal hormone, the cortisol/DHEA-ratio may represent a prognostic tool for the evaluation of the course of disease.

In the present study several evidence could be found for the different effects and interactions of the steroid hormone DHEA with the stress and immune system regarding the two

investigated mammalian species. As a consequence, the establishment of a multi-species stress index based on these diverging and not completely comparable results does not seem to be an appropriate tool for an objective and reliable assessment of a potential chronic stress exposure. The cortisol/DHEA-ratio though may help to evaluate the impact of the HPA-axis on the function of the neuro-immune-endocrine network.

10. Literaturverzeichnis

- Aardal, E. & Holm, A.C. (1995). Cortisol in saliva-reference ranges and relation to cortisol in serum. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 33, 927-932.
- Al-Banna, N., Pavlovic, D., Sharawi, N., Bac, V. H., Jaskulski, M., Balzer, C., Weber, S., Nedeljkov, V. & Lehmann, C. (2014). Combination of dehydroepiandrosterone and orthovanadate administration reduces intestinal leukocyte recruitment in models of experimental sepsis. *Microvascular Research*, 95, 82-87.
- Abraham, G. E. (1974). Ovarian and adrenal contribution to peripheral androgens during the menstrual cycle. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 39, 340-346.
- Aguilera, G. (1994). Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 15, 321-350.
- Alam, M. & Dobson, H. (1986). Effect of various veterinary procedures on plasma concentrations of cortisol, luteinising hormone and prostaglandin F2 alpha metabolite in the cow. *The Veterinary Record*, 118, 7-10.
- Almeida, P., Weber, P., Burton, J. & Zanella, A. (2008). Depressed DHEA and increased sickness response behaviors in lame dairy cows with inflammatory foot lesions. *Domestic Animal Endocrinology*, 34, 89-99.
- Altare, F., Durandy, A., Lammas, D., Emile, J.-F., Lamhamedi, S., Le Deist, F., Drysdale, P., Jouanguy, E., Döffinger, R. & Bernaudin, F. (1998). Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science*, 280, 1432-1435.
- Angele, M. K., Catania, R. A., Ayala, A., Cioffi, W. G., Bland, K. I. & Chaudry, I. H. (1998). Dehydroepiandrosterone: an inexpensive steroid hormone that decreases the mortality due to sepsis following trauma-induced hemorrhage. *Archives of Surgery*, 133, 1281-1288.
- Apostolova, G., Schweizer, R. A., Balazs, Z., Kostadinova, R. M. & Odermatt, A. (2005). Dehydroepiandrosterone inhibits the amplification of glucocorticoid action in adipose tissue. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 288, E957-E964.
- Araghiniknam, M., Chung, S., Nelson-White, T., Eskelson, C. & Watson, R. R. (1996). Antioxidant activity of dioscorea and dehydroepiandrosterone (DHEA) in older humans. *Life Sciences*, 59, PL147-PL157.
- Aragno, M., Brignardello, E., Tamagno, E., Gatto, V., Danni, O. & Boccuzzi, G. (1997). Dehydroepiandrosterone administration prevents the oxidative damage induced by acute hyperglycemia in rats. *Journal of Endocrinology*, 155, 233-240.
- Arave, C. & Albright, J. (1976). Social Rank and Physiological Traits of Dairy Cows as Influenced by Changing Group Membership. *Journal of Dairy Science*, 59, 974-981.

- Arbonés, M. L., Ord, D. C., Ley, K., Ratech, H., Maynard-Curry, C., Otten, G., Capon, D. J. & Teddert, T. F. (1994). Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity*, 1, 247-260.
- Archana, R. & Namasivayam, A. (1999). The effect of acute noise stress on neutrophil functions. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 43, 491-495.
- Arlt, W., Hammer, F., Sanning, P., Butcher, S. K., Lord, J. M., Allolio, B., Annane, D. & Stewart, P. M. (2006). Dissociation of serum dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in septic shock. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91, 2548-2554.
- Banbury, L. K. (2009). Stress Biomarkers in the Tear Film, Southern Cross University, Lismore, New South Wales, USA, Phd Thesis.
- Banks, J. A. & Freeman, M. E. (1980). Inhibition of the daily LH release mechanism by progesterone acting at the hypothalamus. *Biology of Reproduction*, 22, 217-222.
- Barkhausen, T., Westphal, B.-M., Pütz, C., Krettek, C. & van Griensven, M. (2006). Dehydroepiandrosterone administration modulates endothelial and neutrophil adhesion molecule expression in vitro. *Critical Care*, 10, R109.
- Baronetzky-Mercier, A. & Göltzenboth, R. (1995). Krankheiten der Zoo-und Wildtiere, *Blackwell Wissenschaftlicher Verlag*.
- Bartholome, B., Spies, C. M., Gaber, T., Schuchmann, S., Berki, T., Kunkel, D., Bienert, M., Radbruch, A., Burmester, G.-R. & Lauster, R. (2004). Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *The FASEB Journal*, 18, 70-80.
- Bartlett, D. (1998). Stress: Perspectives and processes, *McGraw-Hill Education, UK*
- Baulieu, E.-E. (1996). Dehydroepiandrosterone (DHEA): a fountain of youth? *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81, 3147-3151.
- Baulieu, E. E. (1998). Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology*, 23(8), 963-987.
- Beam, S. W. & Butler, W. (1997). Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biology of Reproduction*, 56, 133-142.
- Beerda, B., Schilder, M. B., van Hooff, J. A. & de Vries, H. W. (1997). Manifestations of chronic and acute stress in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 52, 307-319.
- Beineke, A., Siebert, U., Wohlsein, P. & Baumgaertner, W. (2010). Immunology of Whales and Dolphins, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 133(2), 81-94.
- Beishuizen, A., Thijs, L. G. & Vermes, I. (2002). Decreased levels of dehydroepiandrosterone sulphate in severe critical illness: a sign of exhausted adrenal reserve? *Critical Care London*, 6, 434-438.

- Ben-Nathan, D., Padgett, D. A. & Loria, R. M. (1999). Androstenediol and dehydroepiandrosterone protect mice against lethal bacterial infections and lipopolysaccharide toxicity. *Journal of Medical Microbiology*, 48, 425-431.
- Bender, S. (1953). End-results in treatment of primary sterility. *Fertility and Sterility*, 4, 34.
- Bennett, K. A., Moss, S. E., Pomeroy, P., Speakman, J. R. & Fedak, M. A. (2012). Effects of handling regime and sex on changes in cortisol, thyroid hormones and body mass in fasting grey seal pups. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 161, 69-76.
- Besedovsky, H., Del Rey, A., Klusman, I., Furukawa, H., Arditì, G. M. & Kabiersch, A. (1991). Cytokines as modulators of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 40, 613-618.
- Besedovsky, H. O. & Rey, A. D. (1996). Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*, 17, 64-102.
- Bird, C. E., Murphy, J., Boroomand, K., Finnis, W., Dressel, D. & Clark, A. F. (1978). Dehydroepiandrosterone: Kinetics of Metabolism in Normal Men and Women*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 47, 818-822.
- Black, P. H. (2003). The inflammatory response is an integral part of the stress response: Implications for atherosclerosis, insulin resistance, type II diabetes and metabolic syndrome X. *Brain, Behavior, and Immunity*, 17, 350-364.
- Blauer, K. L., Poth, M., Rogers, W. M. & Bernton, E. W. (1991). Dehydroepiandrosterone Antagonizes the Suppressive Effects of Dexamethasone on Lymphocyte Proliferation. *Endocrinology*, 129, 3174-3179.
- Boon, C. & Wray, C. (1989). Building design in relation to the control of diseases of intensively housed livestock. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 43, 149-161.
- Borghetti, P., Saleri, R., Mocchegiani, E., Corradi, A. & Martelli, P. (2009). Infection, immunity and the neuroendocrine response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 130, 141-162.
- Brasseur, S., Czeck, R., Diederichs, B., Galatius, A., Jensen, L.F., Körber, P., Siebert, U., Teilmann, J., Klöpffer, S. (2014). Grey Seal surveys in the Wadden Sea and Helgoland in 2013-2014. Wilhelmshaven.
- Breier, B. (1999). Regulation of protein and energy metabolism by the somatotrophic axis. *Domestic Animal Endocrinology*, 17, 209-218.
- Browne, P., Conley, A. J., Spraker, T., Ream, R. R. & Lasley, B. L. (2006). Sex steroid concentrations and localization of steroidogenic enzyme expression in free-ranging female northern fur seals (*Callorhinus ursinus*). *General and Comparative Endocrinology*, 147, 175-183.

- Buckham Sporer, K., Weber, P., Burton, J., Earley, B. & Crowe, M. (2008a). Transportation of young beef bulls alters circulating physiological parameters that may be effective biomarkers of stress. *Journal of Animal Science*, 86, 1325-1334.
- Buckham Sporer, K., Xiao, L., Tempelman, R., Burton, J., Earley, B. & Crowe, M. (2008b). Transportation stress alters the circulating steroid environment and neutrophil gene expression in beef bulls. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 121, 300-320.
- Burchfield, S. R. (1979). The stress response: a new perspective. *Psychosomatic Medicine*, 41, 661-672.
- Butler, S. T., Marr, A., Pelton, S., Radcliff, R., Lucy, M. C. & Butler, W. (2003). Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *Journal of Endocrinology*, 176, 205-217.
- Butcher, S. K., Killampalli, V., Lascelles, D., Wang, K., Alpar, E. K. & Lord, J. M. (2005). Raised cortisol: DHEAS ratios in the elderly after injury: potential impact upon neutrophil function and immunity. *Aging Cell*, 4, 319-324.
- Cai, T.-Q., Weston, P., Lund, L., Brodie, B., McKenna, D. & Wagner, W. (1994). Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *American Journal of Veterinary Research*, 55, 934-943.
- Cannon, W. B. (1916). Bodily changes in pain, hunger, fear, and rage: An account of recent researches into the function of emotional excitement, *D. Appleton*.
- Cannon, W. B. (1932). The wisdom of the body. *W W Norton & Co. New York, USA*
- Carlitz, E. H., Kirschbaum, C., Stalder, T. & van Schaik, C. P. (2014). Hair as a long-term retrospective cortisol calendar in orang-utans (*Pongo* spp.): New perspectives for stress monitoring in captive management and conservation. *General and Comparative Endocrinology*, 195, 151-156.
- Casson, P. R., Andersen, R. N., Herrod, H. G., Stentz, F. B., Straughn, A. B., Abraham, G. E. & Buster, J. E. (1993). Oral dehydroepiandrosterone in physiologic doses modulates immune function in postmenopausal women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 169, 1536-1539.
- Challis J.R.G & Olson D.M. (1988) Parturition. In *The Physiology of Reproduction*, Editors: Knobil, E. & Neill, J., *Raven Press*, New York, pp 2177–2216.
- Champagne, C. D., Houser, D. S., Costa, D. P. & Crocker, D. E. (2012). The effects of handling and anesthetic agents on the stress response and carbohydrate metabolism in northern elephant seals. *PLoS One*, 7, e38442.
- Chandra, R. K. (1997). Nutrition and the immune system: an introduction. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 66, 460S-463S.
- Chase, H. B. (1954). Growth of the hair. *Physiological Reviews*, 34, 113-126.

- Chen, C. C. & Parker Jr, C. R. (2004) Adrenal androgens and the immune system. Seminars in *Reproductive Medicine*, Vol. 22, No. 4, 369-377.
- Chrousos, G. (2000). The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 24, S50-5.
- Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*, 5, 374-381.
- Chrousos, G. P. & Gold, P. W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama*, 267, 1244-1252.
- Clarke, D., Fearon, U., Cunningham, S. & McKenna, T. (1996). The steroidogenic effects of β -endorphin and joining peptide: a potential role in the modulation of adrenal androgen production. *Journal of Endocrinology*, 151, 301-307.
- Clemmons, D. R. & Underwood, L. E. (1991). Nutritional regulation of IGF-I and IGF binding proteins. *Annual Review of Nutrition*, 11, 393-412.
- Clerici, M., Trabattoni, D., Piconi, S., Fusi, M. L., Ruzzante, S., Clerici, C. & Villa, M. L. (1997). A possible role for the cortisol/anticortisol imbalance in the progression of human immunodeficiency virus. *Psychoneuroendocrinology*, 22, S27-S31.
- Cohen, S., Kessler, R. C. & Gordon, L. U. (1997). Measuring stress: A guide for health and social scientists, *Oxford University Press*.
- Comin, A., Peric, T., Corazzin, M., Veronesi, M. C., Meloni, T., Zufferli, V., Cornacchia, G. & Prandi, A. (2013). Hair cortisol as a marker of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation in Friesian dairy cows clinically or physiologically compromised. *Livestock Science*, 152, 36-41.
- Constable, S., Parslow, A., Dutton, G., Rogers, T. & Hogg, C. (2006). Urinary cortisol sampling: a non-invasive technique for examining cortisol concentrations in the Weddell seal, *Leptonychotes weddellii*. *Zoo Biology*, 25, 137-144.
- Contreras, L. N., Arregger, A. L., Persi, G. G., Gonzalez, N. S. & Cardoso, E. M. (2004). A new less-invasive and more informative low-dose ACTH test: salivary steroids in response to intramuscular corticotrophin. *Clinical Endocrinology*, 61, 675-682.
- Cook, C., Mellor, D., Harris, P., Ingram, J. & Matthews, L. (2000). Hands-on and hands-off measurement of stress. The biology of animal stress. *CABI Publishing*, 123-46.
- Cook, C. J. (2002). Rapid noninvasive measurement of hormones in transdermal exudate and saliva. *Physiology & Behavior*, 75, 169-181.
- Cumming, D., Rebar, R., Hopper, B. & Yen, S. (1982). Evidence for an Influence of the Ovary on Circulating Dehydroepiandrosterone Sulfate Levels. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 54, 1069-1071.

- Curtin, N. M., Boyle, N. T., Mills, K. H. & Connor, T. J. (2009). Psychological stress suppresses innate IFN- γ production via glucocorticoid receptor activation: Reversal by the anxiolytic chlordiazepoxide. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23, 535-547.
- Cutler jr, G. B., Davis, S. E., Johnsonbaugh, R. E. & Loriaux, D. L. (1979). Dissociation of cortisol and adrenal androgen secretion in patients with secondary adrenal insufficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 49, 604-609.
- Cyr, N. E. & Romero, L. M. (2007). Chronic stress in free-living European starlings reduces corticosterone concentrations and reproductive success. *General and Comparative Endocrinology*, 151, 82-89.
- Dahl, G., Buchanan, B. & Tucker, H. (2000). Photoperiodic effects on dairy cattle: a review. *Journal of Dairy Science*, 83, 885-893.
- Dallman, M. F. & Bhatnagar, S. (2010). Chronic Stress and Energy Balance: Role of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis. *Comprehensive Physiology*.
- Danenberg, H. D., Alpert, G., Lustig, S. & Ben-Nathan, D. (1992). Dehydroepiandrosterone protects mice from endotoxin toxicity and reduces tumor necrosis factor production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36, 2275-2279.
- Dantzer, R. & Kelley, K. W. (1989). Stress and immunity: an integrated view of relationships between the brain and the immune system. *Life Sciences*, 44, 1995-2008.
- Dardevet, D., Sornet, C., Savary, I., Debras, E., Patureau-Mirand, P. & Grizard, J. (1998). Glucocorticoid effects on insulin-and IGF-I-regulated muscle protein metabolism during aging. *Journal of Endocrinology*, 156, 83-89.
- Daynes, R. A. & Araneo, B. A. (1989). Contrasting effects of glucocorticoids on the capacity of T cells to produce the growth factors interleukin 2 and interleukin 4. *European Journal of Immunology*, 19, 2319-2325.
- Daynes, R. A., Dudley, D. J. & Araneo, B. A. (1990). Regulation of murine lymphokine production in vivo II. Dehydroepiandrosterone is a natural enhancer of interleukin 2 synthesis by helper T cells. *European Journal of Immunology*, 20, 793-802.
- de Groot, J., Ruis, M. A., Scholten, J. W., Koolhaas, J. M. & Boersma, W. J. (2001). Long-term effects of social stress on antiviral immunity in pigs. *Physiology & Behavior*, 73, 145-158.
- de Jong, I. C., Prelle, I. T., van de Burgwal, J. A., Lambooi, E., Korte, S. M., Blokhuis, H. J. & Koolhaas, J. M. (2000). Effects of environmental enrichment on behavioral responses to novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs. *Physiology & Behavior*, 68, 571-578.
- Depledge, M. (1998). Recovery of ecosystems and their components following exposure to pollution. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 6, 199-206.
- Desportes, G., Buholzer, L., Anderson-Hansen, K., Blanchet, M.-A., Acquarone, M., Shephard, G., Brando, S., Vossen, A. & Siebert, U. (2007). Decrease Stress; Train

- Your Animals: The Effect of Handling Methods on Cortisol Levels in Harbour Porpoises (*Phocoena phocoena*) Under Human Care. *Aquatic Mammals*, 33, 286-292.
- Dettmer, E. L., Phillips, K. A., Rager, D. R., Bernstein, I. S. & Fragaszy, D. M. (1996). Behavioral and cortisol responses to repeated capture and venipuncture in Cebus apella. *American Journal of Primatology*, 38, 357-362.
- Dhabhar, F. S. & McEwen, B. S. (1997). Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: A potential role for leukocyte trafficking. *Brain, Behavior, and Immunity*, 11, 286-306.
- Dhabhar, F. S., Miller, A. H., McEwen, B. S. & Spencer, R. L. (1995). Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. *The Journal of Immunology*, 154, 5511-5527.
- Dickerson, G. (1970). Efficiency of animal production—molding the biological components. *Journal of Animal Science*, 30, 849-859.
- Dierauf, L. & Gulland, F. M. (2001). CRC handbook of marine mammal medicine: health, disease, and rehabilitation, *CRC Press*.
- Ditchkoff, S. S., Saalfeld, S. T. & Gibson, C. J. (2006). Animal behavior in urban ecosystems: modifications due to human-induced stress. *Urban Ecosystems*, 9, 5-12.
- Dobson, H. & Smith, R. (2000). What is stress, and how does it affect reproduction? *Animal Reproduction Science*, 60, 743-752.
- Drackley, J. K. (1999). Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *Journal of Dairy Science*, 82, 2259-2273.
- Drackley, J. K., Dann, H. M., Douglas, G. N., Guretzky, N. A. J., Litherland, N. B., Underwood, J. P. & Looor, J. J. (2005). Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Growth*, 7.
- Drackley, J. (2006). Advances in transition cow biology: new frontiers in production diseases. Production disease in farms animals. *Wageningen Academic Publishers*, Wageningen, The Netherlands, 24-34.
- Dreschel, N. A. & Granger, D. A. (2009). Methods of collection for salivary cortisol measurement in dogs. *Hormones and Behavior*, 55, 163-168.
- Drucker, W. D., Blumberg, J. M., Gandy, H. M., David, R. R. & Verde, A. L. (1972). Biologic Activity of Dehydroepiandrosterone Sulfate in Man *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 35, 48-54.
- du Dot, T. J., Rosen, D. A., Richmond, J. P., Kitaysky, A. S., Zinn, S. A. & Trites, A. W. (2009). Changes in glucocorticoids, IGF-I and thyroid hormones as indicators of nutritional stress and subsequent refeeding in Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 152, 524-534.

- Echternkamp, S. (1984). Relationship between LH and cortisol in acutely stressed beef cows. *Theriogenology*, 22, 305-311.
- Edmonson, A., Lean, I., Weaver, L., Farver, T. & Webster, G. (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 72, 68-78.
- Eisner, B. G. (1963). Some psychological differences between fertile and infertile women. *Journal of Clinical Psychology*, 19, 391-395.
- Ekkel, E., Van Doorn, C., Helsing, M. & Tielen, M. (1995). The specific-stress-free housing system has positive effects on productivity, health, and welfare of pigs. *Journal Of Animal Science-Menasha Then Albany Then Champaign Illinois*, 73, 1544-1544.
- Elenkov, I. J. (2004). Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1024, 138-146.
- Elenkov, I. J. & Chrousos, G. P. (1999). Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 10, 359-368.
- Elenkov, I. J. & Chrousos, G. P. (2002). Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 966, 290-303.
- Endoh, A., Kristiansen, S. B., Casson, P. R., Buster, J. E. & Hornsby, P. J. (1996). The zona reticularis is the site of biosynthesis of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in the adult human adrenal cortex resulting from its low expression of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81, 3558-3565.
- Ensminger, D. C., Somo, D. A., Houser, D. S. & Crocker, D. E. (2014). Metabolic responses to adrenocorticotrophic hormone (ACTH) vary with life-history stage in adult male northern elephant seals. *General and Comparative Endocrinology*, 204, 150-157.
- Epstein, F. H. & Reichlin, S. (1993). Neuroendocrine-immune interactions. *New England Journal of Medicine*, 329, 1246-1253.
- Epstein, F. H., Manning, H. L. & Schwartzstein, R. M. (1995). Pathophysiology of dyspnea. *New England Journal of Medicine*, 333, 1547-1553.
- Erb, R., Tillson, S., Hodgen, G. & Plotka, E. (1970). Urinary creatinine as an index compound for estimating rate of excretion of steroids in the domestic sow. *Journal of Animal Science*, 30, 79-85.
- Eriksson, H. & Gustafsson, J.-A. (1970). Steroids in germfree and conventional rats. Distribution and excretion of labelled pregnenolone and corticosterone in male and female rats. *European Journal of Biochemistry/FEBS*, 15, 132-139.
- Eskesen, I. G., Teilmann, J., Geertsen, B. M., Desportes, G., Riget, F., Dietz, R., Larsen, F. & Siebert, U. (2009). Stress level in wild harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) during satellite tagging measured by respiration, heart rate and cortisol. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 89, 885.

- Evans, G. W. (1984). Environmental stress, *Cambridge University Press (CUP) Archive*.
- Fair, P. A. & Becker, P. R. (2000). Review of stress in marine mammals. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 7, 335-354.
- Falany, C. (1997). Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *The FASEB Journal*, 11, 206-216.
- Fauci, A. (1978). Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of glucocorticoids. *Monographs on Endocrinology*, 12, 449-465.
- Fell, L., Shutt, D. & Bentley, C. (1985). Development of a salivary cortisol method for detecting changes in plasma "free" cortisol arising from acute stress in sheep. *Australian Veterinary Journal*, 62, 403-406.
- Fernández, M., Alvarez, L. & Zarco, L. (2007). Regrouping in lactating goats increases aggression and decreases milk production. *Small Ruminant Research*, 70, 228-232.
- Fink, G. (2000). Encyclopedia of Stress, Three-Volume Set, *Academic Press*.
- Fonfara, S., Siebert, U., Prange, A. & Colijn, F. (2007). The impact of stress on cytokine and haptoglobin mRNA expression in blood samples from harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 87, 305.
- Franchimont, D., Martens, H., Hagelstein, M.-T., Louis, E., Dewe, W., Chrousos, G. P., Belaiche, J. & Geenen, V. (1999). Tumor necrosis factor α decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84, 2834-2839.
- Frantz, M. (2005). Dehydroepiandrosteron (DHEA): Ein Steroidhormon mit immunmodulatorischem Potential im Hinblick auf die PBMC-Funktion abdominal-chirurgischer Patienten. Ludwig-Maximilians-Universität München, Dissertation.
- Frieden, E. & Lipner, H. (1971). Biochemical Endocrinology of the Vertebrates, *Prentice-Hal*, New Jersey, USA.
- Fullard, R. J. & Tucker, D. L. (1991). Changes in human tear protein levels with progressively increasing stimulus. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 32, 2290-2301.
- Galatius, A., Brasseur, S., Czeck, R., Diederichs, B., Jensen, L.F., Körber, P., Siebert, U., Teilmann, J., Klöpffer, S. (2014). Aerial surveys of Harbour Seals in the Wadden Sea in 2014. Wilhelmshaven.
- Gallagher, P., Watson, S., Smith, M. S., Young, A. H. & Ferrier, I. N. (2007). Plasma cortisol-dehydroepiandrosterone (DHEA) ratios in schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophrenia Research*, 90, 258-265.
- Gayrard, V., Alvinerie, M. & Toutain, P. (1996). Interspecies variations of corticosteroid-binding globulin parameters. *Domestic Animal Endocrinology*, 13, 35-45.

- Gill, J., Vythilingam, M. & Page, G. G. (2008). Low cortisol, high DHEA, and high levels of stimulated TNF- α , and IL-6 in women with PTSD. *Journal of Traumatic Stress*, 21, 530-539.
- Girotti, M., Donegan, J. J. & Morilak, D. A. (2011). Chronic intermittent cold stress sensitizes neuro-immune reactivity in the rat brain. *Psychoneuroendocrinology*, 36, 1164-1174.
- Glaser, R., MacCallum, R. C., Laskowski, B. F., Malarkey, W. B., Sheridan, J. F. & Kiecolt-Glaser, J. K. (2001). Evidence for a shift in the Th-1 to Th-2 cytokine response associated with chronic stress and aging. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 56, M477-M482.
- Godbout, J. P. & Glaser, R. (2006). Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 1, 421-427.
- Gordon, C., LeBoff, M. & Glowacki, J. (2001). Adrenal and gonadal steroids inhibit IL-6 secretion by human marrow cells. *Cytokine*, 16, 178-186.
- Granger, D. A., Cicchetti, D., Rogosch, F. A., Hibel, L. C., Teisl, M. & Flores, E. (2007). Blood contamination in children's saliva: Prevalence, stability, and impact on the measurement of salivary cortisol, testosterone, and dehydroepiandrosterone. *Psychoneuroendocrinology*, 32, 724-733.
- Gray, S. J., Benson, J. A., Reifenshtein, R. W. & Spiro, H. M. (1951). Chronic stress and peptic ulcer: I. Effect of corticotropin (ACTH) and cortisone on gastric secretion. *Journal of the American Medical Association*, 147, 1529-1537.
- Grehn, F. (2008). Tränenorgane. *Augenheilkunde*, 71-80.
- Grissom, N. & Bhatnagar, S. (2009). Habituation to repeated stress: get used to it. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92, 215-224.
- Gröschl, M. (2008). Current status of salivary hormone analysis. *Clinical Chemistry*, 54, 1759-1769.
- Grubb Jr, T. C. (1989). Ptilochronology: feather growth bars as indicators of nutritional status. *The Auk*, 314-320.
- Grummer, R. R. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal Of Animal Science-Menasha Then Albany Then Champaign Illinois*, 73, 2820-2820.
- Guidry, A., Paape, M. & Pearson, R. (1976). Effects of parturition and lactation on blood and milk cell concentrations, corticosteroids, and neutrophil phagocytosis in the cow. *American Journal of Veterinary Research*, 37, 1195-1200.
- Guilliams, T. G. & Edwards, L. (2010). Chronic stress and the HPA axis. *The Standard* (2), 1-12.
- Gulland, F., Haulena, M., Lowenstine, L., Munro, C., Graham, P., Bauman, J. & Harvey, J. (1999). Adrenal function in wild and rehabilitated pacific harbor seals (*Phoca vitulina*

- richardii*) and in seals with phocine herpesvirus-associated adrenal necrosis. *Marine Mammal Science*, 15, 810-827.
- Gundlach, N.H., Piechotta, M. & Siebert, U. (2014). Is lachrymal fluid a potential method for cortisol measurement in wild harbor seals: A pilot study? *International Journal of Veterinary Medicine: Research & Reports*
- Haddad, J. J., Saadé, N. E. & Safieh-Garabedian, B. (2002). Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. *Journal of Neuroimmunology*, 133, 1-19.
- Haebler, R. & Moeller, R. (1993). Pathobiology of selected marine mammal diseases. In: Couch, J. A. (1993). Pathobiology of marine and estuarine organisms (Vol. 2). *CRC Press*. Chapter 8, 217.
- Haerkoenen, T., Dietz, R., Reijnders, P., Teilmann, J., Harding, K., Hall, A., Brasseur, S., Siebert, U., Goodman S. J., Dau Rasmussen, T. & Thompson, P. (2006). The 1988 and 2002 Phocine Distemper Virus Epidemics in European Harbour Seals, *Diseases of Aquatic Organisms*, 68(2), 115-130.
- Hammer, F., Subtil, S., Lux, P., Maser-Gluth, C., Stewart, P. M., Allolio, B. & Arlt, W. (2005). No evidence for hepatic conversion of dehydroepiandrosterone (DHEA) sulfate to DHEA: in vivo and in vitro studies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90, 3600-3605.
- Hammond, P. S., McLeod, K., & Scheidat, M. (2006). Small Cetaceans in the European Atlantic and North Sea (SCANS-II). *LIFE project number LIFE04NAT/GB/000245*, final report.
- Harrison, R. J. & Tomlinson, J. D. W (1956) Observations on the venous system in certain pinnipedia and cetacea, *Proceedings of the Zoological Society of London*, London, 126 (2), 205-234
- Hasselmeier, I., Fonfara, S., Driver, J. & Siebert, U. (2008). Differential hematology profiles of free-ranging, rehabilitated, and captive harbor seals (*Phoca vitulina*) of the German North Sea. *Aquatic Mammals*, 34, 149-156.
- Hay, M. & Mormede, P. (1998). Urinary excretion of catecholamines, cortisol and their metabolites in Meishan and Large White sows: validation as a non-invasive and integrative assessment of adrenocortical and sympathoadrenal axis activity. *Veterinary Research*, 29, 119-128.
- Hay, M., Meunier-Salaün, M., Brulaud, F., Monnier, M. & Mormède, P. (2000). Assessment of hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sympathetic nervous system activity in pregnant sows through the measurement of glucocorticoids and catecholamines in urine. *Journal of Animal Science*, 78, 420-428.
- Hazeldine, J., Arlt, W. & Lord, J. M. (2010). Dehydroepiandrosterone as a regulator of immune cell function. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 120, 127-136.

- Hemsworth, P., Barnett, J., Tilbrook, A. & Hansen, C. (1989). The effects of handling by humans at calving and during milking on the behaviour and milk cortisol concentrations of primiparous dairy cows. *Applied Animal Behaviour Science*, 22, 313-326.
- Hernandez, C. E., Thierfelder, T., Svennersten-Sjaunja, K., Berg, C., Orihuela, A. & Lidfors, L. (2014). Time lag between peak concentrations of plasma and salivary cortisol following a stressful procedure in dairy cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56, 61.
- Herr, H., Scheidat, M., Lehnert, K. & Siebert, U. (2009). Seals at sea: modelling seal distribution in the German bight based on aerial survey data. *Marine Biology*, 156, 811-820.
- Hicks, T. A., McGlone, J. J., Whisnant, C. S., Kattesh, H. G. & Norman, R. L. (1998). Behavioral, endocrine, immune, and performance measures for pigs exposed to acute stress. *Journal Of Animal Science-Menasha Then Albany Then Champaign Illinois*, 76, 474-483.
- Higashiyama, Y., Nashiki, M., Narita, H. & Kawasaki, M. (2007). A brief report on effects of transfer from outdoor grazing to indoor tethering and back on urinary cortisol and behaviour in dairy cattle. *Applied Animal Behaviour Science*, 102, 119-123.
- Higuchi, K., Nawata, H., Kato, K. & Ibayashi, H. (1985). Ovine prolactin potentiates the action of adrenocorticotrophic hormone on the secretion of dehydroepiandrosterone sulfate and dehydroepiandrosterone from cultured bovine adrenal cells. *Hormone and Metabolic Research* 17, 451-453.
- Hirvonen, J. & Pyörälä, S. (1998). Acute-phase response in dairy cows with surgically-treated abdominal disorders. *The Veterinary Journal*, 155, 53-61.
- Holzhausen, L. (2012). Einfluss des Insulin-like Growth Factor Systems auf die endokrinologische Antwort nach einer experimentell induzierten Inflammation des Uterus. Tierärztlichen Hochschule Hannover, Dissertation.
- Hopster, H., van der Werf, J. T. & Blokhuis, H. J. (1998). Stress enhanced reduction in peripheral blood lymphocyte numbers in dairy cows during endotoxin-induced mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 66, 83-97.
- Hopster, H., Van der Werf, J. T., Erkens, J. H. & Blokhuis, H. J. (1999). Effects of repeated jugular puncture on plasma cortisol concentrations in loose-housed dairy cows. *Journal Of Animal Science-Menasha Then Albany Then Champaign Illinois*, 77, 708-714.
- Houe, H., Østergaard, S., Thilasing-Hansen, T., Jørgensen, R. J., Larsen, T., Sørensen, J. T., Agger, J. & Blom, J. (2000). Milk fever and subclinical hypocalcaemia--an evaluation of parameters on incidence risk, diagnosis, risk factors and biological effects as input for a decision support system for disease control. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 42, 1-29.
- Huszenicza, G., Jánosi, S., Gáspárdy, A. & Kulcsár, M. (2004). Endocrine aspects in pathogenesis of mastitis in postpartum dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 82, 389-400.

- Imrich, R. (2002). The role of neuroendocrine system in the pathogenesis of rheumatic diseases (minireview). *Endocrine Regulations*, 36, 95-106.
- Ingvartsen, K. L. (2006). Feeding-and management-related diseases in the transition cow: Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Animal Feed Science and Technology*, 126, 175-213.
- Ingvartsen, K. L. & Andersen, H. R. (1993). Space allowance and type of housing for growing cattle: A review of performance and possible relation to neuroendocrine function. *Acta Agriculturae Scandinavica A-Animal Sciences*, 43, 65-80.
- Ingvartsen, K. L., Andersen, H. R. & Foldager, J. (1992). Effect of sex and pregnancy on feed intake capacity of growing cattle. *Acta Agriculturae Scandinavica A-Animal Sciences*, 42, 40-46.
- Ingvartsen, K. L., Dewhurst, R. & Friggens, N. (2003). On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livestock Production Science*, 83, 277-308.
- Janeway Jr, C. A. & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20, 197-216.
- Jansen, J. K., Boveng, P. L., Dahle, S. P. & Bengtson, J. L. (2010). Reaction of harbor seals to cruise ships. *The Journal of Wildlife Management*, 74, 1186-1194.
- Jeckel, C., Lopes, R. P., Berleze, M. C., Luz, C., Feix, L., Argimon, I., Stein, L. M. & Bauer, M. E. (2010). Neuroendocrine and immunological correlates of chronic stress in 'strictly healthy' populations. *Neuroimmunomodulation*, 17, 9-18.
- Jedrzejuk, D., Medras, M., Milewicz, A. & Demissie, M. (2003). Dehydroepiandrosterone replacement in healthy men with age-related decline of DHEA-S: effects on fat distribution, insulin sensitivity and lipid metabolism. *The Aging Male*, 6, 151-156.
- Jessop, D. S. (1999). Stimulatory and inhibitory regulators of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 13, 491-501.
- Judd, A. M., Call, G. B., Barney, M., McIlmoil, C. J., Balls, A. G., Adams, A. & Oliveira, G. K. (2000). Possible Function of IL-6 and TNF as Intraadrenal Factors in the Regulation of Adrenal Steroid Secretion. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 917, 628-637.
- Kakuschke, A. & Prange, A. (2007). The influence of metal pollution on the immune system a potential stressor for marine mammals in the North Sea. *International Journal of Comparative Psychology*, 20.
- Kalimi, M., Shafagoj, Y., Loria, R., Padgett, D. & Regelson, W. (1994). Anti-glucocorticoid effects of dehydroepiandrosterone (DHEA). *Molecular and Cellular Biochemistry*, 131, 99-104.

- Kelton, D. F., Lissemore, K. D. & Martin, R. E. (1998). Recommendations for recording and calculating the incidence of selected clinical diseases of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 81, 2502-2509.
- Kennedy, S., Smyth, J., Cush, P., Duignan, P., Platten, M., McCullough, S. J. & Allan, G. (1989). Histopathologic and immunocytochemical studies of distemper in seals. *Veterinary Pathology Online*, 26, 97-103.
- Kessing, S. V. (1967). Mucous gland system of the conjunctiva. A quantitative normal anatomical study. *Acta Ophthalmologica*, Suppl 95: 1+-1+.
- Khram, N. M. (2011). Effects of Dexamethasone and Training on the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Response on Mild Stress Challenge in Dairy Cows. University of Veterinary Medicine Hannover, doctoral thesis
- Kidd, R. (1991). Interpreting neutrophil numbers. *Veterinary Medicine (USA)*.
- Kidd, P. (2003). Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Alternative Medicine Review*, 8, 223-246.
- Kim, M. S., Shigenaga, J., Moser, A., Grunfeld, C. & Feingold, K. R. (2004). Suppression of DHEA sulfotransferase (Sult2A1) during the acute-phase response. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 287, E731-E738.
- Kim, I.-H., Na, K.-J. & Yang, M.-P. (2005). Immune responses during the peripartum period in dairy cows with postpartum endometritis. *Journal of Reproduction and Development*, 51, 757-764.
- Kindahl, H., Kornmatitsuk, B. & Gustafsson, H. (2004). The cow in endocrine focus before and after calving. *Reproduction in Domestic Animals*, 39, 217-221.
- King, J. E. (1983). Seals of the world. British Museum (Natural History), London, United Kingdom and Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Kirschbaum, C. & Hellhammer, D. H. (1989). Salivary cortisol in psychobiological research: an overview. *Neuropsychobiology*, 150-69.
- Kirschbaum, C. & Hellhammer, D. H. (2000). Salivary cortisol. *Encyclopedia of Stress*, 3, 379-383.
- Knight, C. H. (2001). Lactation and gestation in dairy cows: flexibility avoids nutritional extremes. *Proceedings of the Nutrition Society*, 60, 527-537.
- Knöferl, M. W., Angele, M. K., Catania, R. A., Diodato, M. D., Bland, K. I. & Chaudry, I. H. (2003). Immunomodulatory effects of dehydroepiandrosterone in proestrus female mice after trauma-hemorrhage. *Journal of Applied Physiology*, 95, 529-535.
- Konduru, L. (2012). Biomarkers Of Chronic Stress. University of Pittsburgh, USA, doctoral thesis.
- Konigsson, K., Savoini, G., Govoni, N., Invernizzi, G., Prandi, A., Kindahl, H. & Veronesi, M. C. (2008). Energy balance, leptin, NEFA and IGF-I plasma concentrations and

- resumption of post partum ovarian activity in swedish red and white breed cows. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50, 3-30.
- Koolhaas, J., Meerlo, P., De Boer, S., Strubbe, J. & Bohus, B. (1997). The temporal dynamics of the stress response. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 21, 775-782.
- Koolhaas, J., Bartolomucci, A., Buwalda, B., De Boer, S., Flügge, G., Korte, S., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B. & Palanza, P. (2011). Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35, 1291-1301.
- Kroboth, P. D., Salek, F. S., Pittenger, A. L., Fabian, T. J. & Frye, R. F. (1999). DHEA and DHEA-S: a review. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 39, 327-348.
- Kulcsár, M., Jánosi, S., Lehtolainen, T., Kátai, L., Delavaud, C., Balogh, O., Chilliard, Y., Pyörälä, S., Rudas, P. & Huszenicza, G. (2005). Feeding-unrelated factors influencing the plasma leptin level in ruminants. *Domestic Animal Endocrinology*, 29, 214-226.
- Kurzman, I. D., Panciera, D. L., Miller, J. B. & MacEwen, E. G. (1998). The Effect of Dehydroepiandrosterone Combined with a Low-Fat Diet in Spontaneously Obese Dogs: A Clinical Trial. *Obesity Research*, 6, 20-28.
- Labrie, F. (1991). Intracrinology. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 78, C113-C118.
- Labrie, F., Bélanger, A., Cusan, L., Gomez, J.-L. & Candas, B. (1997). Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82, 2396-2402.
- Ladewig, J. (2000). Chronic intermittent stress: a model for the study of long-term stressors. *The Biology of Animal Stress*, 159-169.
- LeBlanc, S. (2010). Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *Journal of Reproduction and Development*, 56, S29-S35.
- Lefcourt, A., Bitman, J., Kahl, S. & Wood, D. (1993). Circadian and ultradian rhythms of peripheral cortisol concentrations in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 76, 2607-2612.
- Lejeune-Lenain, C., Van Cauter, E., Désir, D., Beyloos, M. & Franckson, J. (1987). Control of circadian and episodic variations of adrenal androgens secretion in man. *Journal of Endocrinological Investigation*, 10, 267-276.
- Lennartsson, A.-K., Kushnir, M. M., Bergquist, J. & Jonsdottir, I. H. (2012). DHEA and DHEA-S response to acute psychosocial stress in healthy men and women. *Biological Psychology*, 90, 143-149.
- Lidgard, D. C., Boness, D. J., Bowen, W. D. & McMillan, J. I. (2008). The implications of stress on male mating behavior and success in a sexually dimorphic polygynous mammal, the grey seal. *Hormones and Behavior*, 53, 241-248.
- Lippman, M. (1978). Glucocorticoid receptors and effects in human lymphoid and leukemic cells. *Monographs on Endocrinology*, 12, 377-397.

- Longcope, C. (1986). Adrenal and gonadal androgen secretion in normal females. *Clinics in Endocrinology and Metabolism*, 15, 213-228.
- Longcope, C. (1996). Dehydroepiandrosterone metabolism. *Journal of Endocrinology*, 150, S125-S127.
- Loria, R. & Ben-Nathan, D. (2011). Protective effects of DHEA and AED against viral, bacterial and parasitic infections. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 66, 119-129.
- Loria, R. M., Inge, T. H., Cook, S. S., Szakal, A. K. & Regelson, W. (1988). Protection against acute lethal viral infections with the native steroid dehydroepiandrosterone (DHEA). *Journal of Medical Virology*, 26, 301-314.
- Lucke, K., Siebert, U., Sundermeyer, J. & Benke, H. (2006). TP1-Weiterführende Untersuchungen zum Einfluß akustischer Emissionen von Offshore Windenergieanlagen auf marine Säuger in Nord-und Ostsee. *Minos/Plus-Weiterführende Arbeiten an Seevögeln und marinen Säugern zur Bewertung von Offshore-Windkraftanlagen. Zweiter Zwischenbericht*, 10-27.
- Lutz, C., Tiefenbacher, S., Jorgensen, M., Meyer, J. & Novak, M. (2000). Techniques for collecting saliva from awake, unrestrained, adult monkeys for cortisol assay. *American Journal of Primatology*, 52, 93-99.
- Lynam, E., Sklar, L. A., Taylor, A. D., Neelamegham, S., Edwards, B. S., Smith, C. W. & Simon, S. I. (1998). Beta2-integrins mediate stable adhesion in collisional interactions between neutrophils and ICAM-1-expressing cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 64, 622-630.
- Lynch, M. & Bodley, K. (2007): Phocid Seals. In: West, G., Heard, D. & Caulkett, N.: Zoo animal and wildlife immobilization and anesthesia. 1. edition, *Blackwell*, Iowa, Oxford, Victoria, 459-468
- Mader, T. L. (2003). Environmental stress in confined beef cattle. *Journal of Animal Science*, 81, 110-119.
- Maninger, N., Wolkowitz, O. M., Reus, V. I., Epel, E. S. & Mellon, S. H. (2009). Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30, 65-91.
- Maninger, N., Capitanio, J. P., Mason, W. A., Ruys, J. D. & Mendoza, S. P. (2010). Acute and chronic stress increase DHEAS concentrations in rhesus monkeys. *Psychoneuroendocrinology*, 35, 1055-1062.
- Mansfeld, R., Heuwieser, W., Metzner, M. & Schafers, M. (2000). Die fortlaufende Konditionsbeurteilung. *Milchpraxis*, 38, 180-185.
- Marcos, A., Nova, E. & Montero, A. (2003). Changes in the immune system are conditioned by nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57, S66-S69.
- Marinelli, L., Trevisi, E., Da Dalt, L., Merlo, M., Bertoni, G. & Gabai, G. (2007). Dehydroepiandrosterone secretion in dairy cattle is episodic and unaffected by ACTH stimulation. *Journal of Endocrinology*, 194, 627-35.

- Marshall, G. D., Agarwal, S. K., Lloyd, C., Cohen, L., Henninger, E. M. & Morris, G. J. (1998). Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students. *Brain, Behavior, and Immunity*, 12, 297-307.
- Marx, C., Petros, S., Bornstein, S. R., Weise, M., Wendt, M., Menschikowski, M., Engelmann, L. & Höffken, G. (2003). Adrenocortical hormones in survivors and nonsurvivors of severe sepsis: diverse time course of dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone-sulfate, and cortisol. *Critical Care Medicine*, 31, 1382-1388.
- Mashburn, K. L. & Atkinson, S. (2004). Evaluation of adrenal function in serum and feces of Stellar sea lions (*Eumetopias jubatus*): influences of molt, gender, sample storage, and age on glucocorticoid metabolism. *General and Comparative Endocrinology*, 136, 371-381.
- Mateus, L., Da Costa, L. L., Carvalho, H., Serra, P. & Robalo Silva, J. (2002). Blood and intrauterine leukocyte profile and function in dairy cows that spontaneously recovered from postpartum endometritis. *Reproduction in Domestic Animals*, 37, 176-180.
- Matter, R., Carroll, J. & Dyer, C. (2000). Neuroendocrine responses to stress. *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*, 43.
- Matousek, R. H., Dobkin, P. L. & Pruessner, J. (2010). Cortisol as a marker for improvement in mindfulness-based stress reduction. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 16, 13-19.
- May, M., Holmes, E., Rogers, W. & Poth, M. (1990). Protection from glucocorticoid induced thymic involution by dehydroepiandrosterone. *Life Sciences*, 46, 1601-1609.
- McCobb, E. C., Patronek, G. J., Marder, A., Dinnage, J. D. & Stone, M. S. (2005). Assessment of stress levels among cats in four animal shelters. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226, 548-555.
- McCusker, R. (1998). Controlling insulin-like growth factor activity and the modulation of insulin-like growth factor binding protein and receptor binding. *Journal of Dairy Science*, 81, 1790-1800.
- McEwen, B. S. (1998). Stress, adaptation, and disease: Allostasis and allostatic load. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 840, 33-44.
- McEwen, B. S. (2008). Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *European Journal of Pharmacology*, 583, 174-185.
- McEwen, B. S. & Sapolsky, R. M. (1995). Stress and cognitive function. *Current Opinion in Neurobiology*, 5, 205-216.
- McEwen, B. S. & Stellar, E. (1993). Stress and the individual: mechanisms leading to disease. *Archives of Internal Medicine*, 153, 2093-2101.
- McEwen, B. S. & Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*, 43, 2-15.

- McEwen, B. S., Biron, C. A., Brunson, K. W., Bulloch, K., Chambers, W. H., Dhabhar, F. S., Goldfarb, R. H., Kitson, R. P., Miller, A. H. & Spencer, R. L. (1997). The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Research Reviews*, 23, 79-133.
- McLean, M. & Smith, R. (2001). Corticotrophin-releasing hormone and human parturition. *Reproduction*, 121, 493-501.
- McRae, S., Younger, K., Thompson, D. & Wingate, D. (1982). Sustained mental stress alters human jejunal motor activity. *Gut*, 23, 404-409.
- Mellor, D., Cook, C. & Stafford, K. (2000). Quantifying some responses to pain as a stressor. *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Welfare*, 171-198.
- Metz, J. & Mekking, P. (1984). Crowding phenomena in dairy cows as related to available idling space in a cubicle housing system. *Applied Animal Behaviour Science*, 12, 63-78.
- Meyerholz, M. (2014). Einfluss der Frühträchtigkeit auf die metabolische Adaptation bei Färsen mit besonderer Bedeutung des Wachstumshormons und insulinähnlichen Wachstumsfaktors. Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation.
- Miller, G. E., Chen, E. & Zhou, E. S. (2007). If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans. *Psychological Bulletin*, 133, 25.
- Miller, R. E. & Fowler, M. E. (2014). Fowler's zoo and wild animal medicine, *Elsevier Health Sciences*.
- Minton, J. (1994). Function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic nervous system in models of acute stress in domestic farm animals. *Journal of Animal Science*, 72, 1891-1898.
- Mizock, B. A. (1995). Alterations in carbohydrate metabolism during stress: a review of the literature. *The American Journal of Medicine*, 98, 75-84.
- Moberg, G. P. & Mench, J. A. (2000). The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare, *CABI Publishing*
- Moe, R. O. & Bakken, M. (1996). Effect of repeated blood sampling on plasma concentrations of cortisol and testosterone and on leucocyte number in silver fox vixens (*Vulpes vulpes*). *Acta Agriculturae Scandinavica A-Animal Sciences*, 46, 111-116.
- Monk, C. S., Hart, K. A., Berghaus, R. D., Norton, N. A., Moore, P. A. & Myrna, K. E. (2014). Detection of endogenous cortisol in equine tears and blood at rest and after simulated stress. *Veterinary Ophthalmology*, 17, 53-60.
- Morgan, C. A., Southwick, S., Hazlett, G., Rasmusson, A., Hoyt, G., Zimolo, Z. & Charney, D. (2004). Relationships Among Plasma Dehydroepiandrosterone Sulfate and Cortisol Levels, Symptoms of Dissociation, and Objective Performance in Humans Exposed to Acute Stress. *Archives of General Psychiatry*, 61, 819-825.

- Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené, D., Malmkvist, J., Manteca, X., Manteuffel, G., Prunet, P. & van Reenen, C. G. (2007). Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology & Behavior*, 92, 317-339.
- Möstl, E., Janowski, T., Palme, R., Rás, A., Zduńczyk, S. & Bamberg, E. (1989). Dehydroepiandrosterone and epitestosterone in the blood of cows at term. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 36, 104-109.
- Möstl, E., Maggs, J., Schrötter, G., Besenfelder, U. & Palme, R. (2002). Measurement of cortisol metabolites in faeces of ruminants. *Veterinary Research Communications*, 26, 127-139.
- Möstl, E. & Palme, R. (2002). Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology*, 23, 67-74.
- Mühlenbein, M. P., Campbell, B. C., Richards, R. J., Svec, F., Phillippi-Falkenstein, K. M., Murchison, M. A. & Myers, L. (2003). Dehydroepiandrosterone-sulfate as a biomarker of senescence in male non-human primates. *Experimental Gerontology*, 38, 1077-1085.
- Müller, S., Lehnert, K., Seibel, H., Driver, J., Ronnenberg, K., Teilmann, J., van Elk, C., Kristensen, J., Everaarts, E. & Siebert, U. (2013). Evaluation of immune and stress status in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*): can hormones and mRNA expression levels serve as indicators to assess stress? *BMC Veterinary Research*, 9, 145.
- Mulligan, F. & Doherty, M. (2008). Production diseases of the transition cow. *The Veterinary Journal*, 176, 3-9.
- Munck, A., Crabtree, G. & Smith, K. (1978). Glucocorticoid receptors and actions in rat thymocytes and immunologically stimulated human peripheral lymphocytes. *Monographs on Endocrinology*, 12, 341-355.
- Murison, R., Overmier, J. B. & Skoglund, E. J. (1986). Serial stressors: prior exposure to a stressor modulates its later effectiveness on gastric ulceration and corticosterone release. *Behavioral and Neural Biology*, 45, 185-195.
- Mysegades, W. (2014). Untersuchungen zur Eignung des Insulin-like Growth Factor I Systems zur Prognose der Gesundheit und Fertilität bei pluriparen Deutschen Holstein Milchkühen. Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation.
- Negrao, J., Porcionato, M., De Passille, A. & Rushen, J. (2004). Cortisol in saliva and plasma of cattle after ACTH administration and milking. *Journal of Dairy Science*, 87, 1713-1718.
- Netherton, C., Goodyer, I., Tamplin, A. & Herbert, J. (2004). Salivary cortisol and dehydroepiandrosterone in relation to puberty and gender. *Psychoneuroendocrinology*, 29, 125-140.
- Neuerer, F., & Hirschberger, J. (1999). Evaluation des Hämatologiegerätes Vet ABC/8P bei Hund, Katze und Pferd. *Der praktische Tierarzt*, 80, 584-594.

- Newman, A., Zanette, L., Clinchy, M., Goodenough, N. & Soma, K. (2013). Stress in the wild: Chronic predator pressure and acute restraint affect plasma DHEA and corticosterone levels in a songbird. *Stress*, 16, 363-367.
- Newman, A. E., Pradhan, D. S. & Soma, K. K. (2008). Dehydroepiandrosterone and corticosterone are regulated by season and acute stress in a wild songbird: jugular versus brachial plasma. *Endocrinology*, 149, 2537-2545.
- Nicholson, M. W., Barclay, A. N., Singer, M. S., Rosen, S. D. & van der Merwe, P. A. (1998). Affinity and kinetic analysis of L-selectin (CD62L) binding to glycosylation-dependent cell-adhesion molecule-1. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 763-770.
- Nicolson, N., Storms, C., Ponds, R. & Sulon, J. (1997). Salivary cortisol levels and stress reactivity in human aging. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 52, M68-M75.
- Nieschlag, E., Loriaux, D., Ruder, H., Zucker, I., Kirschner, M. & Lipsett, M. (1973). The secretion of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulphate in man. *Journal of Endocrinology*, 57, 123-134.
- Nordøy, E., Ingebretsen, O. & Blix, A. (1990). Depressed metabolism and low protein catabolism in fasting grey seal pups. *Acta Physiologica Scandinavica*, 139, 361-369.
- Northridge, S. P. (1991). An updated world review of interactions between marine mammals and fisheries, *Food & Agriculture Organization*.
- Nunez, E. A. & Christeff, N. (1997). What are ago-antagonistic couples? Their role in normal and pathological situations. Therapeutical consequences. *Psychoneuroendocrinology*, 22, S95-S101.
- Oberbeck, R., Dahlweid, M., Koch, R., van Griensven, M., Emmendorfer, A., Tscherne, H. & Pape, H.-C. (2001). Dehydroepiandrosterone decreases mortality rate and improves cellular immune function during polymicrobial sepsis. *Critical Care Medicine*, 29, 380-384.
- Oberbeck, R., Benschop, R., Jacobs, R., Hosch, W., Jetschmann, J., Schürmeyer, T., Schmidt, R. & Schedlowski, M. (1998). Endocrine mechanisms of stress-induced DHEA-secretion. *Journal of Endocrinological Investigation*, 21, 148-153.
- Odell, W. D. & Parker, L. N. (1984). Control of adrenal androgen production. *Endocrine Research*, 10, 617-630.
- Oki, C. & Atkinson, S. (2004). Diurnal patterns of cortisol and thyroid hormones in the Harbor seal (*Phoca vitulina*) during summer and winter seasons. *General and Comparative Endocrinology*, 136, 289-297.
- Oksbjerg, N., Gondret, F. & Vestergaard, M. (2004). Basic principles of muscle development and growth in meat-producing mammals as affected by the insulin-like growth factor (IGF) system. *Domestic Animal Endocrinology*, 27, 219-240.

- Opstad, P. K. (1994). Circadian rhythm of hormones is extinguished during prolonged physical stress, sleep and energy deficiency in young men. *European Journal of Endocrinology*, 131, 56-66.
- Orentreich, N., Brind, J. L., Rizer, R. L. & Vogelman, J. H. (1984). Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 59, 551-555.
- Ortiz, R., Noren, D., Ortiz, C. & Talamantes, F. (2003). GH and ghrelin increase with fasting in a naturally adapted species, the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*). *Journal of Endocrinology*, 178, 533-539.
- Ott, R., Bretzlaff, K. & Hixon, J. (1986). Comparison of palpable corpora lutea with serum progesterone concentrations in cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 188, 1417-1419.
- Ottaviani, E. & Franceschi, C. (1996). The neuroimmunology of stress from invertebrates to man. *Progress in Neurobiology*, 48, 421-440.
- Padgett, D. A., Loria, R. M. & Sheridan, J. F. (1997). Endocrine regulation of the immune response to influenza virus infection with a metabolite of DHEA-androstenediol. *Journal of Neuroimmunology*, 78, 203-211.
- Palme, R., Fischer, P., Schildorfer, H. & Ismail, M. (1996). Excretion of infused 14 C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. *Animal Reproduction Science*, 43, 43-63.
- Palme, R. (2005). Measuring fecal steroids: guidelines for practical application. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046, 75-80.
- Palme, R. (2012). Monitoring stress hormone metabolites as a useful, non-invasive tool for welfare assessment in farm animals. *Animal Welfare-The UFAW Journal*, 21, 331.
- Parker, C. R. (1999). Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate production in the human adrenal during development and aging. *Steroids*, 64, 640-647.
- Parker Jr, C. R. & Baxter, C. R. (1985). Divergence in adrenal steroid secretory pattern after thermal injury in adult patients. *The Journal of Trauma*, 25, 508-510.
- Parker, L. N. & Odell, W. D. (1980). Control of Adrenal Androgen Secretion. *Endocrine Reviews*, 1, 392-410.
- Parker, L. N., Levin, E. R. & Lifrak, E. T. (1985). Evidence for Adrenocortical Adaptation to Severe Illness. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 60, 947-952.
- Patel, O., Takahashi, T., Takenouchi, N., Hirako, M., Sasaki, N. & Domekis, I. (1996). Peripheral cortisol levels throughout gestation in the cow: Effect of stage of gestation and foetal number. *British Veterinary Journal*, 152, 425-432.
- Pérez, G. C., Laita, S. G.-B., del Portal, J. I. & Liesa, J. P. (2004). Validation of an EIA [enzyme immunoassay] technique for the determination of salivary cortisol in cattle. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2, 45-51.

- Perret, M. & Aujard, F. (2005). Aging and season affect plasma dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) levels in a primate. *Experimental Gerontology*, 40, 582-587.
- Peschko, V., Ronnenberg, K., Siebert, U., & Gilles, A. (2015). Trends of harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) density in the southern North Sea. *Ecological Indicators*, 60, 174-183.
- Petrauskas, L., Atkinson, S., Gulland, F., Mellish, J. A. & Horning, M. (2008). Monitoring glucocorticoid response to rehabilitation and research procedures in California and Steller sea lions. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 309, 73-82.
- Philipot, J., Pluvinage, P., Cimarosti, I., Sulpice, P. & Bugnard, F. (1994). Risk factors of dairy cow lameness associated with housing conditions. *Veterinary Research*, 25, 244-248.
- Phillips, A. C., Carroll, D., Gale, C. R., Lord, J. M., Arlt, W. & Batty, G. D. (2010). Cortisol, DHEAS, their ratio and the metabolic syndrome: evidence from the Vietnam Experience Study. *European Journal of Endocrinology*, 162, 919-923.
- Piechotta, M., Sander, A., Kastelic, J., Wilde, R., Heppelmann, M., Rudolphi, B., Schuberth, H., Bollwein, H. & Kaske, M. (2012). Short communication: Parturum plasma insulin-like growth factor-I concentrations based on day of insemination are lower in cows developing postpartum diseases. *Journal of Dairy Science*, 95, 1367-1370.
- Piechotta, M., Holzhausen, L., Araujo, M. G., Heppelmann, M., Sipka, A., Pfarrer, C., Schuberth, H.-J. & Bollwein, H. (2014). Antepartal insulin-like growth factor concentrations indicating differences in the metabolic adaptive capacity of dairy cows. *Journal of Veterinary Science*, 15, 343.
- Pratschke, S., von Dossow-Hanfstingl, V., Dietz, J., Schneider, C. P., Tufman, A., Albertsmeier, M., Winter, H. & Angele, M. K. (2014). Dehydroepiandrosterone modulates T-cell response after major abdominal surgery. *Journal of Surgical Research*, 189, 117-125.
- Pryce, J., Royal, M., Garnsworthy, P. & Mao, I. L. (2004). Fertility in the high-producing dairy cow. *Livestock Production Science*, 86, 125-135.
- Przekop, F., Stupnicka, E., Wolińska-Witort, E., Mateusiak, K., Sadowski, B. & Domański, E. (1985). Changes in circadian rhythm and suppression of the plasma cortisol level after prolonged stress in the sheep. *Acta Endocrinologica*, 110, 540-545.
- Purifoy, F. E. (1981). Endocrine-environment interaction in human variability. *Annual Review of Anthropology*, 141-162.
- Purifoy, F. E., Koopmans, L. H. & Tatum, R. W. (1980). Steroid hormones and aging: free testosterone, testosterone and androstenedione in normal females aged 20-87 years. *Human biology*, 181-191.
- R Development Core Team (2011). R: A Language and Environment for Statistical

Computing, Vienna: R Foundation for Statistical Computing, www.Rproject.org

- Raff, H., Tzankoff, S. P. & Fitzgerald, R. S. (1981). ACTH and cortisol responses to hypoxia in dogs. *Journal of Applied Physiology*, 51, 1257-1260.
- Raff, H., Shinsako, J., Keil, L. C. & Dallman, M. F. (1983). Vasopressin, ACTH, and corticosteroids during hypercapnia and graded hypoxia in dogs. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 244, E453-E458.
- Rasmussen, K. R., Healey, M. C., Cheng, L. & Yang, S. (1995). Effects of dehydroepiandrosterone in immunosuppressed adult mice infected with *Cryptosporidium parvum*. *The Journal of Parasitology*, 429-433.
- Rauw, W., Kanis, E., Noordhuizen-Stassen, E. & Grommers, F. (1998). Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. *Livestock Production Science*, 56, 15-33.
- Richmond, J. P., Skinner, J., Gilbert, J., Mazzaro, L. M. & Zinn, S. A. (2008). Comparison of the somatotrophic axis in free-ranging and rehabilitated harbor seal pups (*Phoca vitulina*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 39, 342-348.
- Riley, V. (1981). Psychoneuroendocrine influences on immunocompetence and neoplasia. *Science*, 212, 1100-1109.
- Ritsner, M., Maayan, R., Gibel, A., Strous, R. D., Modai, I. & Weizman, A. (2004). Elevation of the cortisol/dehydroepiandrosterone ratio in schizophrenia patients. *European Neuropsychopharmacology*, 14(4), 267-273.
- Riviere, J. E., Engelhardt, F. R. & Solomon, J. (1977). The relationship of thyroxine and cortisol to the moult of the harbor seal (*Phoca vitulina*). *General and Comparative Endocrinology*, 31, 398-401.
- Roberts, E., Bologa, L., Flood, J. F. & Smith, G. E. (1987). Effects of dehydroepiandrosterone and its sulfate on brain tissue in culture and on memory in mice. *Brain Research*, 406, 357-362.
- Romero, L. M. (2004). Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 249-255.
- Romero, M. L. & Butler, L. K. (2007). Endocrinology of stress. *International Journal of Comparative Psychology*, 20.
- Rooney, N. J., Gaines, S. A. & Bradshaw, J. W. (2007). Behavioural and glucocorticoid responses of dogs (*Canis familiaris*) to kennelling: investigating mitigation of stress by prior habituation. *Physiology & Behavior*, 92, 847-854.
- Rosenfeld, R., Rosenberg, B., Fukushima, D. K. & Hellman, L. (1975). 24-Hour secretory pattern of dehydroisoandrosterone and dehydroisoandrosterone sulfate. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 40, 850-855.
- Roth, J. A. (1985). Cortisol as mediator of stress-associated immunosuppression in cattle. *Animal Stress*. Springer.

- Royo, F., Mayo, S., Carlsson, H.-E. & Hau, J. (2008). Egg corticosterone: a noninvasive measure of stress in egg-laying birds. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 22, 310-314.
- Ruis, M. A., Te Brake, J. H., Engel, B., Ekkel, E. D., Buist, W. G., Blokhuis, H. J. & Koolhaas, J. M. (1997). The circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs: effects of age, gender, and stress. *Physiology & Behavior*, 62, 623-630.
- Rundlett, S. E. & Miesfeld, R. L. (1995). Quantitative differences in androgen and glucocorticoid receptor DNA binding properties contribute to receptor-selective transcriptional regulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 109, 1-10.
- Rushen, J., Butterworth, A. & Swanson, J. (2011). Animal behavior and well-being symposium: Farm animal welfare assurance: Science and application. *Journal of Animal Science*, 89, 1219-1228.
- Rushen, J., Munksgaard, L., Marnet, P. & DePassillé, A. (2001). Human contact and the effects of acute stress on cows at milking. *Applied Animal Behaviour Science*, 73, 1-14.
- Russell, E., Koren, G., Rieder, M. & Van Uum, S. (2012). Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology*, 37, 589-601.
- Samuel, W., Pybus, M. & Kocan, A. (2001). Lungworms of marine mammals. *Parasitic Diseases of Wild Mammals*, 279-300.
- Saner, K. J., Suzuki, T., Sasano, H., Pizzey, J., Ho, C., Strauss III, J. F., Carr, B. R. & Rainey, W. E. (2005). Steroid sulfotransferase 2A1 gene transcription is regulated by steroidogenic factor 1 and GATA-6 in the human adrenal. *Molecular Endocrinology*, 19, 184-197.
- Sanning, P. (2010). Die Stressantwort der hormonellen Nebennierenrindenaktivität auf ACTH-Stimulation und in der Sepsis. Universität Würzburg, Dissertation.
- Sapolsky, R. M. (1987). Stress, social status, and reproductive physiology in free-living baboons. In: Crews, D. (Ed), (1987). *Psychobiology of reproductive behavior: An evolutionary perspective.*, (pp. 291-322). Englewood Cliffs, Prentice-Hall, Incorporation. New Jersey, USA
- Sapolsky, R. M. (1992). Do glucocorticoid concentrations rise with age in the rat? *Neurobiology of Aging*, 13, 171-174.
- Scherz, W. & Dohlman, C. H. (1975). Is the lacrimal gland dispensable?: Keratoconjunctivitis sicca after lacrimal gland removal. *Archives of Ophthalmology*, 93, 281-283.
- Schmut, O., Horwath-Winter, J., Brogyanyi, S., Kirchengast, S., Wachswender, C. & Gruber, A. (2002). Quantitative Bestimmung von Harnsäure in menschlicher Tränenflüssigkeit. *Spektrum der Augenheilkunde*, 16, 161-163.

- Schulz, P., Kirschbaum, C., Prüßner, J. & Hellhammer, D. (1998). Increased free cortisol secretion after awakening in chronically stressed individuals due to work overload. *Stress and Health*, 14, 91-97.
- Schwartz, E. B., Granger, D. A., Susman, E. J., Gunnar, M. R., & Laird, B. (1998). Assessing salivary cortisol in studies of child development. *Child Development*, 69(6), 1503-1513.
- Seal, U. S. & Doe, R. (1966). Corticosteroid-binding globulin: Biochemistry, physiology, and phylogeny. *Steroid Dynamics*, 63.
- Selye, H. (1950). Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal*, 1, 1383.
- Selye, H. & Fortier, C. (1950). Adaptive reaction to stress. *Psychosomatic Medicine*, 12, 149-157.
- Selye, H. (1955). Stress and disease. *The Laryngoscope*, 65, 500-514.
- Shealy, C. N. (1995). A review of dehydroepiandrosterone (DHEA). *Integrative Physiological and Behavioral Science*, 30, 308-313.
- Sheldon, I. M., Lewis, G. S., LeBlanc, S. & Gilbert, R. O. (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, 65, 1516-1530.
- Sheldon, I. M., Williams, E. J., Miller, A. N., Nash, D. M. & Herath, S. (2008). Uterine diseases in cattle after parturition. *The Veterinary Journal*, 176, 115-121.
- Sheldon, I., Price, S., Cronin, J., Gilbert, R. & Gadsby, J. (2009). Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 1-9.
- Sheriff, M. J., Dantzer, B., Delehanty, B., Palme, R. & Boonstra, R. (2011). Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*, 166, 869-887.
- Shufelt, C., Bretsky, P., Almeida, C. M., Johnson, B. D., Shaw, L. J., Azziz, R., Braunstein, G. D., Pepine, C. J., Bittner, V. & Vido, D. A. (2010). DHEA-S levels and cardiovascular disease mortality in postmenopausal women: results from the National Institutes of Health—National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI)-sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95, 4985-4992.
- Siebert, U., Gilles, A., Lucke, K., Ludwig, M., Benke, H., Kock, K. H., & Scheidat, M. (2006). A decade of harbour porpoise occurrence in German waters—analyses of aerial surveys, incidental sightings and strandings. *Journal of Sea Research*, 56(1), 65-80.
- Siebert, U., Wohlsein, P., Lehnert, K. & Baumgärtner, W. (2007). Pathological findings in harbour seals (*Phoca vitulina*): 1996–2005. *Journal of Comparative Pathology*, 137, 47-58.

- Siebert, U., Gulland, F., Harder, T., Jauniaux, T., Seibel, H., Wohlsein, P. & Baumgärtner, W. (2010). Epizootics in harbour seals (*Phoca vitulina*): clinical aspects. *NAMMCO Scientific Publications*, 8, 265-274.
- Siebert, U., Pozniak, B., Anderson Hansen, K., Nordstrom, G., Teilmann, J., Van Elk, N., Vossen, A. & Dietz, R. (2012). Investigations of Thyroid and Stress Hormones in Free-Ranging and Captive Harbor Porpoises (*Phocoena Phocoena*): A Pilot Study, *Aquatic Mammals* 37 (4), 443-453.
- Simmonds, M. P. & Dolman, S. J. (2008). All at sea: renewable energy production in the context of marine nature conservation. *Offshore Wind Farms And Marine Mammals: Impacts & Methodologies For Assessing Impacts*, 6.
- Smith, R., Mesiano, S., Chan, E.-C., Brown, S. & Jaffe, R. B. (1998). Corticotropin-Releasing Hormone Directly and Preferentially Stimulates Dehydroepiandrosterone Sulfate Secretion by Human Fetal Adrenal Cortical Cells 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83, 2916-2920.
- Spangelo, B., Judd, A., Call, G., Zumwalt, J. & Gorospe, W. (1995). Role of the cytokines in the hypothalamic-pituitary-adrenal and gonadal axes. *Neuroimmunomodulation*, 2, 299-312.
- Spencer, N. F., Norton, S. D., Harrison, L. L., Li, G.-Z. & Daynes, R. A. (1996). Dysregulation of IL-10 production with aging: possible linkage to the age-associated decline in DHEA and its sulfated derivative. *Experimental Gerontology*, 31, 393-408.
- Spencer, R. L., Kalman, B. A. & Dhabhar, F. S. (2011). Role of endogenous glucocorticoids in immune system function: regulation and counterregulation. *Comprehensive Physiology*.
- Spicer, L., Tucker, W. & Adams, G. (1990). Insulin-like growth factor-I in dairy cows: relationships among energy balance, body condition, ovarian activity, and estrous behavior. *Journal of Dairy Science*, 73, 929-937.
- Spicer, L., Alpizar, E. & Echtenkamp, S. (1993). Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor I production in vitro. *Journal of Animal Science*, 71, 1232-1241.
- Sterling, P. & Eyer, J. (1988). Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology, *John Wiley & Sons*, Oxford, England.
- Stolp, R., Rijnberk, A., Meijer, J. & Croughs, R. (1983). Urinary corticoids in the diagnosis of canine hyperadrenocorticism. *Research in Veterinary Science*, 34, 141-144.
- Stone, A. A., Schwartz, J. E., Smyth, J., Kirschbaum, C., Cohen, S., Hellhammer, D. & Grossman, S. (2001). Individual differences in the diurnal cycle of salivary free cortisol: a replication of flattened cycles for some individuals. *Psychoneuroendocrinology*, 26, 295-306.
- Straub, R., Konecna, L., Hrach, S., Rothe, G., Kreutz, M., Scholmerich, J., Falk, W. & Lang, B. (1998). Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively

- correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro: possible link between endocrinosenescence and immunosenescence. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83, 2012-2017.
- Straub, R., Glück, T., Cutolo, M., Georgi, J., Helmke, K., Schölmerich, J., Vaith, P. & Lang, B. (2000). The adrenal steroid status in relation to inflammatory cytokines (interleukin-6 and tumour necrosis factor) in polymyalgia rheumatica. *Rheumatology*, 39, 624-631.
- Straub, R. H., Lehle, K., Herfarth, H., Weber, M., Falk, W., Preuner, J. & Scholmerich, J. (2002). Dehydroepiandrosterone in relation to other adrenal hormones during an acute inflammatory stressful disease state compared with chronic inflammatory disease: role of interleukin-6 and tumour necrosis factor. *European Journal of Endocrinology*, 146, 365-374.
- Stupnicki, R. & Obminski, Z. (1992). Glucocorticoid response to exercise as measured by serum and salivary cortisol. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 65, 546-549.
- Sullivan, D. A. (2004). Tearful relationships? Sex, hormones, the lacrimal gland, and aqueous-deficient dry eye. *The Ocular Surface*, 2, 92-123.
- Sullivan, D. A., Wickham, L. A., Rocha, E. M., Kelleher, R. S., da Silveira, L. A. & Toda, I. (1998). Influence of gender, sex steroid hormones, and the hypothalamic-pituitary axis on the structure and function of the lacrimal gland. *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes 2*. Springer.
- Suttie, J. M., Fennessy, P. F., Corson, I. D., Laas, F. J., Crosbie, S. F., Butler, J. H. & Gluckman, P. D. (1989). Pulsatile growth hormone, insulin-like growth factors and antler development in red deer (*Cervus elaphus scoticus*) stags. *Journal of Endocrinology*, 121, 351-360.
- Suzuki, T., Suzuki, N., Daynes, R. A. & Engleman, E. G. (1991). Dehydroepiandrosterone enhances IL2 production and cytotoxic effector function of human T cells. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 61, 202-211.
- Swietlik, M. (2008). Grundbegriffe der Umweltpsychologie: Stressoren (Klima, Hitze, Kälte, Gerüche, Schadstoffe), *GRIN Verlag*, München.
- Tamashiro, K., Sakai, R., Shively, C., Karatsoreos, I. & Reagan, L. (2011). Chronic stress, metabolism, and metabolic syndrome. *Stress*, 14, 468-474.
- Taylor, V., Beever, D., Wathes, D., Kebreab, E. & Mills, J. (2004). Physiological adaptations to milk production that affect the fertility of high yielding dairy cows. Dairying: using science to meet consumers' needs. Conference Proceedings, University of Reading, UK, September 2002., *Nottingham University Press*, 37-71.
- Tchernof, A. & Labrie, F. (2004). Dehydroepiandrosterone, obesity and cardiovascular disease risk: a review of human studies. *European Journal of Endocrinology*, 151, 1-14.

- Teruhisa, U., Ryoji, H., Taisuke, I., Tatsuya, S., Fumihiko, M. & Tatsuo, S. (1981). Use of saliva for monitoring unbound free cortisol levels in serum. *Clinica Chimica Acta*, 110, 245-253.
- Thieringer, R., Le Grand, C. B., Carbin, L., Cai, T.-Q., Wong, B., Wright, S. D. & Hermanowski-Vosatka, A. (2001). 11β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is induced in human monocytes upon differentiation to macrophages. *The Journal of Immunology*, 167, 30-35.
- Thompson, R. F. & Spencer, W. A. (1966). Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychological Review*, 73, 16.
- Thorpe, W. (1944) Some Problems of animal learning. Proceedings of the Linnean Society of London. *Wiley Online Library*, 70-83.
- Toda, M., Morimoto, K., Nagasawa, S. & Kitamura, K. (2004). Effect of snack eating on sensitive salivary stress markers cortisol and chromogranin A. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 9, 27-29.
- Tort, L., Sunyer, J., Gómez, E. & Molinero, A. (1996). Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 51, 179-188.
- Tracey, K. J. (2002). The inflammatory reflex. *Nature*, 420, 853-859.
- Trevisi, E. & Bertoni, G. (2009). Some physiological and biochemical methods for acute and chronic stress evaluation in dairy cows. *Italian Journal of Animal Science*, 8, 265-286.
- Trites, A. & Donnelly, C. (2003). The decline of Steller sea lions *Eumetopias jubatus* in Alaska: a review of the nutritional stress hypothesis. *Mammal Review*, 33, 3-28.
- Turner, B. B. (1997). Influence of gonadal steroids on brain corticosteroid receptors: a minireview. *Neurochemical Research*, 22, 1375-1385.
- Van Haeringen, N. J. (1981). Clinical biochemistry of tears. *Survey of Ophthalmology*, 26, 84-96.
- van Niekerk, J. K., Huppert, F. A. & Herbert, J. (2001). Salivary cortisol and DHEA: association with measures of cognition and well-being in normal older men, and effects of three months of DHEA supplementation. *Psychoneuroendocrinology*, 26, 591-612.
- Van Weerden, W., Bierings, H., Van Steenbrugge, G., De Jong, F. & Schröder, F. (1992). Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. *Life Sciences*, 50, 857-861.
- Verkerk, G., Phipps, A., Carragher, J., Matthews, L. & Stelwagen, K. (1998). Characterization of milk cortisol concentrations as a measure of short-term stress responses in lactating dairy cows. *Animal Welfare*, 7, 77-86.
- Vincent, I. & Michell, A. (1992). Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. *Research in Veterinary Science*, 53, 342-345.

- Vining, R. F., McGinley, R. A., Maksvytis, J. J. & Ho, K. Y. (1983). Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. *Annals of Clinical Biochemistry: An International Journal of Biochemistry in Medicine*, 20, 329-335.
- Von Borell, E. (1995). Neuroendocrine integration of stress and significance of stress for the performance of farm animals. *Applied Animal Behaviour Science*, 44, 219-227.
- Wagner, W. & Oxenreider, S. (1972). Adrenal function in the cow. Diurnal changes and the effects of lactation and neurohypophyseal hormones. *Journal of Animal Science*, 34, 630-635.
- Walker, B. G., Dee Boersma, P. & Wingfield, J. C. (2006). Habituation of adult Magellanic penguins to human visitation as expressed through behavior and corticosterone secretion. *Conservation Biology*, 20, 146-154.
- Washburn, B. E. & Millspaugh, J. J. (2002). Effects of simulated environmental conditions on glucocorticoid metabolite measurements in white-tailed deer feces. *General and Comparative Endocrinology*, 127, 217-222.
- Watkins, L. R. & Maier, S. F. (1999). Implications of immune-to-brain communication for sickness and pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 7710-7713.
- Webster, A., Pritchard, D., Wathes, C. & Wilesmith, J. (1982). Improvements of environment, husbandry and feeding. *The Control of Infectious Diseases in Farm Animals*, 28-35.
- Wehrmeister, E. (2014). Darstellung der Blutgefäße an der Hinterflosse des europäischen Seehundes (*Phoca vitulina vitulina*) und Beschreibung sowie Erprobung einer minimalinvasiven Blutentnahmelokalisation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation, DVG Service GmbH, Gießen
- Wei, Y., Galaria-Rathod, N., Epstein, S. & Asbell, P. (2013). Tear cytokine profile as a noninvasive biomarker of inflammation for ocular surface diseases: standard operating procedures. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54, 8327-8336.
- Weirup, L., Müller, S., Ronnenberg, K., Rosenberger, T., Siebert, U. & Lehnert, K. (2013). Immune-relevant and new xenobiotic molecular biomarkers to assess anthropogenic stress in seals. *Marine Environmental Research*, 92, 43-51.
- Weiss, D., Helmreich, S., Moestl, E., Dzidic, A. & Bruckmaier, R. (2004). Coping capacity of dairy cows during the change from conventional to automatic milking. *Journal of Animal Science*, 82, 563-570.
- Weiss, E. P., Villareal, D. T., Fontana, L., Han, D.-H. & Holloszy, J. O. (2011). Dehydroepiandrosterone (DHEA) replacement decreases insulin resistance and lowers inflammatory cytokines in aging humans. *Aging* (Albany NY), 3, 533.
- Wessa, M. & Rohleder, N. (2007). Endocrine and inflammatory alterations in post-traumatic stress disorder. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 2, 91-122
- West, J. (2003). Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 86, 2131-2144.

- Westphal, U. F. (1963). Steroid-Protein Interactions. *DTIC Document*.
- Wieland, R. G., de Courcy, C., Levy, R. P., Zala, A. P. & Hirschmann, H. (1965). C19O2 steroids and some of their precursors in blood from normal human adrenals. *Journal of Clinical Investigation*, 44, 159.
- Wikelski, M. & Cooke, S. J. (2006). Conservation physiology. *Trends in Ecology & Evolution*, 21, 38-46.
- Wingfield, J. C., Hunt, K., Breuner, C., Dunlap, K., Fowler, G. S., Freed, L. & Lepson, J. (1997). Environmental stress, field endocrinology, and conservation biology. Behavioral approaches to conservation in the wild. *Cambridge University Press, Cambridge*, 95-131.
- Wingfield, J. C. (2003). Control of behavioural strategies for capricious environments. *Animal Behaviour*, 66, 807-816.
- Wingfield, J. C. (2008). Comparative endocrinology, environment and global change. *General and Comparative Endocrinology*, 157, 207-216.
- Wright, A. J., Deak, T. & Parsons, E. (2009). Concerns related to chronic stress in marine mammals. *Interatinal Whaling Comission Working Paper SC/61 E*, 16.
- Wright, A. J., Soto, N. A., Baldwin, A. L., Bateson, M., Beale, C. M., Clark, C., Deak, T., Edwards, E. F., Fernández, A. & Godinho, A. (2007). Anthropogenic noise as a stressor in animals: a multidisciplinary perspective. *International Journal of Comparative Psychology*, 20.
- Wüst, S., Federenko, I., Hellhammer, D. H. & Kirschbaum, C. (2000). Genetic factors, perceived chronic stress, and the free cortisol response to awakening. *Psychoneuroendocrinology*, 25, 707-720.
- Yakar, S., Liu, J.-L., Stannard, B., Butler, A., Accili, D., Sauer, B. & LeRoith, D. (1999). Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 7324-7329.
- Young, B. (1981). Cold stress as it affects animal production. *Journal of Animal Science*, 52, 154-163.
- Zhang, L., Yue, H., Zhang, H., Xu, L., Wu, S., Yan, H., Gong, Y. & Qi, G. (2009). Transport stress in broilers: I. Blood metabolism, glycolytic potential, and meat quality. *Poultry Science*, 88, 2033-2041.
- Zhang, T. Y., Ding, X. & Daynes, R. A. (2005). The expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type I by lymphocytes provides a novel means for intracrine regulation of glucocorticoid activities. *The Journal of Immunology*, 174, 879-889.
- Zulu, V. C., Nakao, T. & Sawamukai, Y. (2002). Insulin-like growth factor-I as a possible hormonal mediator of nutritional regulation of reproduction in cattle. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64, 657-665.

Zwald, N., Weigel, K., Chang, Y., Welper, R. & Clay, J. (2004). Genetic selection for health traits using producer-recorded data. I. Incidence rates, heritability estimates, and sire breeding values. *Journal of Dairy Science*, 87, 4287-4294.

11. Anhang

Material	Lagerung	Analyse	Besonderheiten
Blut - Serum	gekennzeichnet, bei Raumtemperatur gerinnen lassen, dann zentrifugieren und bei -20°C einfrieren	Cortisol, DHEA, IGF-1	
Blut - EDTA	1. Vollblut kühlen	1. Leukozyten/ Blutbild	EDTA-Plasma zu Jörg Driver

Wichtig: Kennzeichnung der Tiere -> Probenzugehörigkeit

Sektionsergebnis notieren

Abbildung 4: Protokollbogen Probenentnahme erkrankte, freilebende Seehunde

Röhrchen/Material	Wieviel wird benötigt?	Lagerung/ Bearbeitung	Analyse
<p>1. Serumröhrchen (brauner Deckel und braune Aufschrift, Größe 7,5ml/9ml)</p> <p>2. Eppendorfgefäße für Überstand (kleines, durchsichtiges Röhrchen, Größe 1,5ml)</p>	<p>4-5 ml (ca. halbes Röhrchen), maximal 7,5 ml (=ein Röhrchen)</p>	<p>1. Röhrchen kennzeichnen mit Tiername und Entnahmedatum 2. bei Raumtemperatur gerinnen lassen 3. zentrifugieren: 10 Min. bei 3000 U/Min. 4. Überstand abnehmen / abpipettieren und in beschriftete („Serum, Tiername, Datum“) Eppendorfgefäße füllen 5. Eppendorfgefäße mit Überstand bei - 20°C einfrieren</p>	<p>Cortisol, DHEA(S)</p>
<p>kleines EDTA – Röhrchen (roter Deckel und Aufschrift, Größe 2,7ml)</p>	<p>ca. halbes Röhrchen WICHTIG: gut schwänken</p>	<p>1. Plasma kühlen bei 4°C 2. direkt zu Jörg Driever für Analyse</p>	<p>Leukozyten, Blutbild</p>

Abbildung 5: Protokollbogen Probenentnahme habituierte und gesunde, freilebende Robben

Lfd-Nr	Tiernummer	Probendatum	Rasse	Zyklusstand	BCS	Körpertemperatur	Erkrankung?	Serum	EDTA	Besonderheiten
001										
002										
003										
004										
005										
006										
007										
008										
009										
010										

Abbildung 6: Protokollbogen Probenentnahme bei den Milchkühen

Anhang

Tabelle 2: Blutbildergebnisse der Seehunde und Kegelrobben in den drei Untersuchungsgruppen (mean±SEM),
P.v.=*Phoca vitulina vitulina*, *H.g.*= *Halichoerus grypus*

group	species	gender	age (years/ estimated)	nutritional status	leucocytes (4.8-14.25 x10 ⁻⁹ /L)	erythrocytes (4.1-5.5 x10 ⁻¹² /L)	thrombocytes (155-555 x10 ⁻⁹ /l)	hematocrit (45-66 %)	haemoglobin (17.0-23.5 g/dL)	
<i>habituated_zoo</i> (n=8)	P.v.	male	15	good	5	3.7	247	48.5	17.4	
	P.v.	male	32	good	8.9	3.5	381	48.3	17.6	
	P.v.	male	18	good	12	3.64	397	45.4	16.1	
	H.g.	male	38	good	7	3.4	175	42	16.7	
	H.g.	male	34	good	6.2	3.47	376	44.6	17.6	
	H.g.	female	9	good	6.5	4.04	205	46.3	18.6	
	H.g.	female	27	good	5.7	3.71	312	43	17.2	
	H.g.	female	27	good	5	3.77	401	47.7	19	
					mean	6.79	3.65	311.75	45.73	17.53
					SE	0.93	0.07	32.31	0.86	0.33
<i>wild_healthy</i> (n=16)	P.v.	male	(sub)adult	good	9.2	4.6	393	53.7	19.6	
	P.v.	male	(sub)adult	good	11.1	5.12	313	60.7	22	
	P.v.	male	(sub)adult	good	13.2	5.06	333	59.2	21	
	P.v.	male	(sub)adult	moderate	11.5	4.57	386	54.3	20.3	
	P.v.	male	(sub)adult	good	10.4	4.73	391	56.3	20.8	
	P.v.	male	yearling	moderate	8.3	4.97	339	56.2	20.3	
	P.v.	male	(sub)adult	moderate	9.1	4.6	304	53.2	20.6	
	P.v.	male	(sub)adult	moderate	9.9	4.23	407	50.2	19.2	
	P.v.	male	(sub)adult	moderate	11.2	4.79	81	56.5	20	
	P.v.	male	(sub)adult	good	10.4	4.87	306	56.8	20.2	
	P.v.	male	(sub)adult	moderate	10.3	4.59	370	53.7	20.4	
	P.v.	male	(sub)adult	moderate	11.3	5.59	339	54.7	19.9	
	P.v.	male	yearling	moderate	9.2	4.81	473	56.9	20.1	
	P.v.	female	(sub)adult	good	7.7	4.97	354	59.1	21.1	
	P.v.	female	(sub)adult	good	9	5.14	339	62.1	20.7	
	P.v.	female	yearling	moderate	9.1	4.85	390	57.2	23	
				mean	10.06	4.84	344.88	56.30	20.58	
				SE	0.35	0.08	20.74	0.76	0.23	
<i>wild_diseased</i> (n=9)	P.v.	male	yearling	poor	10.4	3.56	294	38.1	14.4	
	P.v.	male	pup	moderate	11.7	4.26	304	46.8	17.1	
	P.v.	male	pup	poor	4.6	3.15	49	38.3	12.2	
	P.v.	male	pup	poor	7.8	4.71	261	51	19.1	
	P.v.	female	yearling	moderate	9.1	4.32	402	47.7	18.2	
	P.v.	female	pup	poor	6.6	5.94	299	61.3	21.8	
	P.v.	female	pup	poor	2.5	5.66	113	56.4	20.3	
	P.v.	female	pup	moderate	8	4.69	87	50.4	17.8	
	P.v.	female	pup	poor	4.3	4.39	383	46.6	16.9	
				mean	7.22	4.52	243.56	48.51	17.53	
				SE	1.00	0.30	43.07	2.52	0.97	

12. Danksagung

Mein ganz spezieller Dank geht an meine beiden „Doktormütter“.

Frau Prof. Prof. h. c. Dr. Ursula Siebert danke ich insbesondere für die Überlassung des Themas, die nette Aufnahme in das Team in Büsum, der Vielzahl an praktischen Einblicken in die Wildtierforschung, der hilfreichen Unterstützung und dem immerwährenden Zugang zu ihrem Wissen.

Frau JProf. Dr. Marion Schmicke danke ich vor allem für die Unterstützung, die Motivation, die problemorientierten und praktischen Hilfestellungen, die netten Gespräche, die Weitergabe ihres Fachwissens, das Zugänglichmachen der Endokrinologie und die unglaubliche Geduld.

Mein herzlicher Dank geht auch an Prof. Dr. Guido Dehnhardt und Dr. Frederike Hanke für die tolle Unterstützung und die fachlichen Einblicke, sowie auch an das weitere Team des Marine Science Center in Rostock.

Ein weiterer Dank geht an Dr. Carsten Ludwig, Dr. Dirk Wewers und den Mitarbeitern des Robbenreviers des Allwetterzoos Münster für die großartige Zusammenarbeit.

Dr. Joachim Schöne und seinem Team des Zoos am Meer danke ich ebenfalls für die Hilfsbereitschaft, das Engagement und die Unterstützung.

Außerdem danke ich Prof. Marcelo A. Gil für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Ein spezieller Dank geht auch an das Endokrinologische Labor der TiHo; danke an Angela, Martina, Sandra und Christel für Eure immer wiederkehrende Hilfe, die Nachsicht und Geduld mit mir und Eurer Unterstützung. Zudem danke ich Dr. Jasmin Gundelach und Dr. Maren Feldman für die Hilfe bei den Ausfahrten.

Matthias Pahls und Albrecht Knief sowie den Mitarbeitern des landwirtschaftlichen Betriebs in Wienhausen möchte ich ebenfalls für die Hilfe und Unterstützung danken.

Auch bei Marions ehemaligen und aktuellen Doktoranden Marie, Kirsten, Janna und Sonja möchte ich mich für den tollen Austausch, die Tipps und die herzliche Aufnahme bedanken. Ganz herzlich möchte ich mich zudem bei Felix Graubner für die Tage im Stall und seine Hilfe bei der Probenentnahme und -aufbereitung bedanken.

Danksagung

Besonderer Dank geht an meine Kollegen am ITAW in Büsum: Susanne, Abbo, Max, Michel, Eva, Owen, Johannes, Andrea, Micha, Kristina, Patrick und natürlich an Bianca, Conny, Miriam, Eva und Arlena. Danke, dass ihr mich so herzlich aufgenommen habt, für eure Hilfe, den Spaß, das offene Ohr, die Unterstützung und für die schöne Zeit in Büsum.

Auch Dr. Jörg Driver möchte ich für die Hilfe, die netten Gespräche und den fachlichen Rat herzlichst danken.

Spezieller Dank geht auch an die Seehundjäger des Landes Schleswig-Holstein, insbesondere an Karl-Heinz Kolle und Thomas Diedrichsen für die Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit.

Dr. Karin Schröder möchte ich für das Verständnis und die Unterstützung in den letzten zweieinhalb Jahren danken. Ein herzliches Dankeschön geht auch an Alex, Sabine und Olga.

Des Weiteren geht ein besonderes Dankeschön an Juli und Anne. Zusammen haben wir trotz der örtlichen Trennung schon wirklich viel geschafft. Ich bin sehr froh, dass es Euch gibt! Auch an meine Gitti den allerliebsten Dank für Deine andauernde Motivation und Deine Freundschaft, die ich auf keinen Fall missen möchte.

Für das unglaubliche Vertrauen, die Motivation, die Auszeiten, den Zusammenhalt und die Liebe danke ich meinen Eltern, Geschwistern und Großeltern. Ohne Euch wäre ich nicht da, wo ich heute bin.

Schlussendlich gilt mein größter Dank Johannes. Danke für Deine großartige Hilfe, Dein Verständnis, für die starke Schulter, dafür dass du mich so gut kennst und trotzdem mit mir alle Höhen und Tiefen meisterst!



ISBN 978-3-86345-290-2



Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
E-Mail: info@dvG.de · Internet: www.dvG.de