

Aus der Klinik für Pferde, Allgemeine Chirurgie und Radiologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**ACTH-MESSUNGEN BEI VERSCHIEDENEN  
SCHMERZZUSTÄNDEN DES PFERDES**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Nina Jaburg**  
Tierärztin aus Hamburg

Berlin 2020  
Journal-Nr.: 4172







Aus der Klinik für Pferde, Allgemeine Chirurgie und Radiologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

# **ACTH-MESSUNGEN BEI VERSCHIEDENEN SCHMERZZUSTÄNDEN DES PFERDES**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Nina Jaburg  
Tierärztin  
aus Hamburg

Berlin 2020

**Journal-Nr.: 4172**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Gehlen  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Corinna Eule

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

horses, pain, senses, corticotropin, blood chemistry, heart rate, hydrocortisone

Tag der Promotion: 04.09.2020

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-074-5

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2020**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2020

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

Meiner Familie



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literatur .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Schmerz.....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Definition.....	3
2.1.2. Nozizeption.....	3
2.1.3. Auswirkungen von Schmerz auf den Organismus .....	4
2.1.3.1. Die Stressantwort.....	4
2.1.3.2. Die Sympathikus-Nebennierenmark-Achse .....	5
2.1.3.3. Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse .....	6
2.1.3.4. Auswirkungen von Schmerz auf das Verhalten .....	7
<b>2.2. Schmerzbeurteilung beim Pferd.....</b>	<b>8</b>
2.2.1. Verhalten .....	8
2.2.2. Klinische Parameter .....	9
2.2.3. Schmerzskalen.....	10
2.2.3.1. Eindimensionale Schmerzskalen.....	10
2.2.3.2. Multidimensionale Schmerzskalen .....	11
2.2.3.3. Schmerzskalen auf der Basis von Gesichtsausdrücken .....	12
2.2.4. ACTH und Kortisol als Schmerzparameter.....	13
<b>2.3. Pituitary Pars Intermedia Dysfunction.....</b>	<b>16</b>
2.3.1. Prävalenz und Epidemiologie .....	16
2.3.2. Physiologie der equinen Hypophyse .....	16
2.3.3. Pathogenese der PPID .....	18
2.3.4. Klinische Symptome.....	20
2.3.5. Diagnose .....	23
2.3.5.1. Klinische Untersuchung .....	23

2.3.5.2.	Blutbild und Blutchemie .....	24
2.3.5.3.	Hormonbestimmung und endokrinologische Funktionstests .....	24
2.3.5.4.	Messung des ACTH-Wertes .....	24
2.3.5.5.	TRH-Stimulationstest .....	27
2.3.5.6.	Dexamethason-Suppressionstest .....	28
2.3.5.7.	Bildgebende Verfahren .....	29
2.3.6.	Therapie .....	29
2.3.6.1.	Pergolid .....	29
2.3.6.2.	Cyproheptadin .....	30
2.3.6.3.	Mönchspfeffer (Vitex agnus castus) .....	30
<b>2.4.</b>	<b>Herzfrequenzvariabilität.....</b>	<b>31</b>
2.4.1.	Definition.....	31
2.4.2.	Analyse der Herzfrequenzvariabilität .....	31
2.4.2.1.	Zeitbezogene Parameter der Herzfrequenzvariabilität .....	32
2.4.2.2.	Frequenzbezogene Parameter der Herzfrequenzvariabilität .....	32
2.4.3.	Die Herzfrequenzvariabilität als Schmerzparameter .....	34
<b>3.</b>	<b>Tiere, Material und Methoden.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1.</b>	<b>Tiere .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>38</b>
3.2.1.	Zusammenfassung des Versuchsablaufs.....	38
3.2.2.	Untersuchungszeitpunkt.....	38
3.2.3.	Untersuchungsbogen .....	38
3.2.4.	Klinische Allgemeinuntersuchung .....	39
3.2.5.	Beurteilung der Schmerzintensität mithilfe einer Schmerzskala .....	39
3.2.6.	Blutuntersuchung .....	42
3.2.6.1.	Blutbild und venöse Blutgase .....	42
3.2.6.2.	ACTH und Kortisol .....	43
3.2.6.3.	TRH-Stimulationstest .....	45
3.2.7.	Analyse der Herzfrequenzvariabilität .....	45

3.2.8. Kontrolluntersuchungen .....	49
<b>3.3. Statistische Auswertung .....</b>	<b>49</b>
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1. Tests auf Normalverteilung.....</b>	<b>51</b>
<b>4.2. Geschlecht, Rasse, Größe, Gewicht, Alter und Diagnosen .....</b>	<b>52</b>
4.2.1. Alle Pferde mit Schmerzen .....	52
4.2.2. Vergleichsgruppe .....	53
<b>4.3. Herzfrequenz, Atemfrequenz und innere Körpertemperatur .....</b>	<b>54</b>
4.3.1. Vergleichsgruppe .....	54
<b>4.4. Schmerzintensität.....</b>	<b>55</b>
4.4.1. Vergleichsgruppe .....	55
<b>4.5. Hämatokrit, Totalprotein, Leukozytenzahl, Laktat und.....</b>	<b>56</b>
<b>pH-Wert.....</b>	<b>56</b>
4.5.1. Vergleichsgruppe .....	56
<b>4.6. ACTH.....</b>	<b>57</b>
4.6.1. ACTH-Basalwert (ACTH 0).....	57
4.6.1.1. Alle Pferde mit Schmerzen .....	57
4.6.1.2. Vergleichsgruppe .....	57
4.6.2. TRH-Stimulationstest (ACTH 30).....	58
4.6.2.1. Vergleichsgruppe .....	61
4.6.3. ACTH-Anstieg .....	63
4.6.3.1. Vergleichsgruppe .....	63
4.6.4. Einfluss der Schmerzintensität auf ACTH .....	64
4.6.4.1. ACTH 0.....	64
4.6.4.2. ACTH 30.....	65
4.6.5. Vergleich zwischen den verschiedenen Schmerzgruppen .....	66
4.6.5.1. ACTH 0.....	66
4.6.5.2. ACTH 30.....	67
4.6.6. Vergleich zwischen den verschiedenen Krankheitsgruppen.....	67

4.6.6.1.	ACTH 0.....	68
4.6.6.2.	ACTH 30.....	68
<b>4.7.</b>	<b>Kortisol.....</b>	<b>69</b>
4.7.1.	Kortisol-Basalwert (Kortisol 0).....	69
4.7.1.1.	Alle Pferde mit Schmerzen.....	69
4.7.1.2.	Vergleichsgruppe.....	69
4.7.2.	TRH-Stimulationstest (Kortisol 30).....	71
4.7.2.1.	Vergleichsgruppe.....	74
4.7.3.	Einfluss der Schmerzintensität auf Kortisol.....	76
4.7.3.1.	Kortisol 0.....	76
4.7.3.2.	Kortisol 30.....	77
4.7.4.	Vergleich zwischen den verschiedenen Schmerzgruppen.....	78
4.7.4.1.	Kortisol 0.....	78
4.7.4.2.	Kortisol 30.....	78
4.7.5.	Vergleich zwischen den verschiedenen Krankheitsgruppen.....	79
4.7.5.1.	Kortisol 0.....	79
4.7.5.2.	Kortisol 30.....	80
<b>4.8.</b>	<b>Herzfrequenzvariabilität.....</b>	<b>81</b>
4.8.1.	LF-Leistung, HF-Leistung und LF/HF-Ratio.....	81
4.8.1.1.	Vergleichsgruppe.....	81
4.8.2.	Einfluss der Schmerzintensität auf die Parameter der HFV.....	83
4.8.2.1.	LF- und HF-Leistung.....	83
4.8.2.2.	LF/HF-Ratio.....	83
4.8.3.	Vergleich zwischen den verschiedenen Schmerzgruppen.....	84
4.8.3.1.	LF- und HF-Leistung.....	84
4.8.3.2.	LF/HF-Ratio.....	84
4.8.4.	Vergleich zwischen den verschiedenen Krankheitsgruppen.....	85
4.8.4.1.	LF- und HF-Leistung.....	85
4.8.4.2.	LH/HF-Ratio.....	86

<b>5. Diskussion .....</b>	<b>87</b>
<b>5.1. Diskussion von Material und Methoden .....</b>	<b>87</b>
5.1.1. Auswahl der Pferde .....	87
5.1.2. Mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch Medikamente .....	88
5.1.3. Die Schmerzskala .....	94
5.1.4. Messung von ACTH und Kortisol .....	98
5.1.5. Durchführung des TRH-Stimulationstests .....	98
5.1.6. Messung der Herzfrequenzvariabilität .....	99
<b>5.2. Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>101</b>
5.2.1. Herzfrequenz, Atemfrequenz und innere Körpertemperatur .....	101
5.2.2. Hämatokrit, Totalprotein, Leukozytenzahl, Laktat und pH-Wert .....	102
5.2.3. ACTH .....	102
5.2.4. ACTH nach TRH-Stimulation .....	105
5.2.5. Kortisol .....	107
5.2.6. Kortisol nach TRH-Stimulation .....	110
5.2.7. Herzfrequenzvariabilität .....	111
5.2.8. Fälle außerhalb der Statistik .....	113
<b>5.3. Beantwortung der Fragen aus der Einleitung .....</b>	<b>115</b>
<b>5.4. Schlussfolgerungen und Ausblick .....</b>	<b>116</b>
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>118</b>
<b>7. Summary .....</b>	<b>121</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>123</b>
<b>9. Anhang .....</b>	<b>147</b>
<b>9.1. Untersuchungsbogen .....</b>	<b>147</b>
<b>9.2. Schmerzskala .....</b>	<b>151</b>
<b>9.3. Medikamentennachweis .....</b>	<b>157</b>
<b>9.4. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>159</b>

9.5. Tabellenverzeichnis .....	165
9.6. Publikationsliste .....	166
<b>Danksagung .....</b>	<b>167</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>168</b>

## Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ACTH 0	ACTH-Basalwert
ACTH 30	ACTH-Wert 30 Minuten nach TRH-Stimulation
ADH	Antidiuretisches Hormon
bzw.	Beziehungsweise
CLIP	Corticotropin-like intermediate lobe peptide
Kortisol 0	Kortisol-Basalwert
Kortisol 30	Kortisolwert 30 Minuten nach TRH-Stimulation
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
DST	Dexamethason-Suppressionstest
ECS	Equines Cushing Syndrom
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
END	Endorphin
FFT	Fast Fourier Transformation
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
ggr.	geringgradig
HF	High Frequency
HFV	Herzfrequenzvariabilität
hgr.	hochgradig
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HRV	Heart rate variability

Hz	Herz
i.m.	intramuskulär
IR	Insulinresistenz
I.U.	International Units
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
LF	Low Frequency
LH	Luteinisierendes Hormon
LPH	Lipotropin
LTH	Luteotropes Hormon
mg	Milligramm
mgr.	mittelgradig
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug
n.u.	normalized units
OP	Operation
PPID	Pituitary Pars Intermedia Dysfunction
pg/ml	Pikogramm pro Milliliter
post	Lateinisch: nach
PRL	Prolaktin
s.c.	subkutan (subcutaneous)
SN-Achse	Sympathikus-Nebennierenmark-Achse
TRH	Thyreotropin-Releasing-Hormon
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon, Thyrotropin
VLF	Very low frequency

## 1. Einleitung

Pferde können, genau wie Menschen, Schmerzen erleiden. Schmerz bei Tieren ist jedoch schwierig zu erfassen, da sie uns ihr Empfinden nicht mitteilen können. Die Erkennung von Schmerz und die Beurteilung seiner Intensität sind daher von großer Bedeutung in der Veterinärmedizin, um eine adäquate Analgesie bereitstellen zu können. Durch Schmerz wird im Körper eine Stressantwort ausgelöst, die unter anderem zu einer Ausschüttung von Stresshormonen sowie zu einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems führt (GUNNAR and QUEVEDO 2007). Auch das Verhalten wird vom Schmerz beeinflusst. Solche Verhaltensweisen in Reaktion auf Schmerz werden zusammen mit klinischen Parametern sowie der Messung von ACTH und/oder Kortisol zur Schmerzbeurteilung verwendet (BUSSIÈRES et al. 2008). Um das Ziel einer möglichst objektiven Evaluierung des Schmerzes zu erreichen, werden immer neue Methoden der Schmerzbeurteilung getestet. Auch die Analyse der Herzfrequenzvariabilität rückt dabei in den Vordergrund. Mit ihr können Rückschlüsse über die Aktivität des autonomen Nervensystems gezogen werden, welches eine wichtige Rolle bei der physiologischen Antwort auf Schmerz spielt (KUWAHARA et al. 1996). Die Herzfrequenzvariabilität könnte damit als weiterer Parameter zur Schmerzbeurteilung verwendet werden.

Die Pituitary Pars Intermedia Dysfunction (PPID), auch als Equines Cushing Syndrom bezeichnet, ist eine der häufigsten endokrinen Erkrankungen älterer Pferde und Ponys (MCGOWAN et al. 2013b). Im Zuge der Erkrankung kommt es zu einer Hyperplasie bis hin zur Bildung von Adenomen in der Pars intermedia der Hypophyse. Die dadurch vermehrte Ausschüttung von Peptiden der Pars intermedia, darunter auch dem adrenocorticotropen Hormon (ACTH), führen zum klinischen Bild der PPID (MCFARLANE 2011). Die Diagnose erfolgt anhand der Messung eines erhöhten ACTH-Wertes im Blut oder mithilfe des TRH-Stimulationstests, bei dem das Plasma-ACTH nach der Injektion von TRH bestimmt wird (SCHOTT et al. 2017).

Eine häufige und sehr schmerzhaft Begleiterkrankung der PPID ist Hufrehe, eine Entzündung der Huflederhaut (COLLINS et al. 2010). Eine Hufrehe kann viele Ursachen haben, oft ist sie aber endokrin bedingt (DONALDSON et al. 2004). Da der Schmerz dieser Erkrankung zu einer Ausschüttung der Stresshormone ACTH und Kortisol führen kann, herrscht häufig Unsicherheit, ob ein unter Schmerzen leidendes Pferd auf PPID getestet werden kann, oder ob der Schmerz durch eine Erhöhung des ACTH-Wertes zu einem falsch-positiven Testergebnis führen würde. Da eine Hufrehe jedoch eine ernsthafte Erkrankung darstellt und nicht selten zur Euthanasie führt, ist es wichtig, frühzeitig die Ursache zu bestimmen, um mit

einer adäquaten Therapie beginnen zu können.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es daher, die Auswirkungen von Schmerz auf den basalen ACTH- und Kortisolwert sowie den TRH-Stimulationstest bei endokrinologisch gesunden Pferden zu untersuchen. Außerdem wurde geprüft, ob die Analyse der Herzfrequenzvariabilität zur Schmerzbeurteilung geeignet ist.

Insbesondere sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Führen Schmerzen zu einem signifikanten Anstieg des ACTH-Wertes im Blut, sodass es zu einem falsch-positiven Ergebnis bei der PPID-Diagnostik schmerzbelasteter Pferde kommen würde?
- Führen Schmerzen zu einem signifikanten Anstieg des ACTH-Wertes nach TRH-Stimulation, sodass die Durchführung des TRH-Stimulationstests bei schmerzbelasteten Pferden zu einem falsch-positiven Ergebnis bei der PPID-Diagnostik führen würde?
- Führen Schmerzen zu einem Anstieg der Kortisolkonzentrationen beim Pferd?
- Gibt es einen Unterschied der ACTH- oder Kortisolkonzentrationen bei verschiedenen Schmerzintensitäten?
- Hat die Schmerzintensität einen Einfluss auf die Höhe der ACTH- oder Kortisolkonzentrationen?
- Gibt es einen Unterschied der ACTH- oder Kortisolkonzentrationen bei verschiedenen Arten von Schmerz?
- Führen Schmerzen zu Veränderungen der frequenzbezogenen Parameter der Herzfrequenzvariabilität und sind diese zur Beurteilung der Schmerzintensität geeignet?

## 2. Literatur

### 2.1. Schmerz

#### 2.1.1. Definition

Die *International Association for the Study of Pain (IASP)* definiert Schmerz als „ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potenzieller Gewebeschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird“ (INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN 1994). MOLONY und KENT (1997) definieren Schmerz bei Tieren als „eine aversive sensorische und emotionale Erfahrung, die ein Bewusstsein des Tieres über einen drohenden oder tatsächlichen Gewebeschaden darstellt. Der Schmerz verändert die Physiologie und das Verhalten des Tieres, mit dem Ziel, den Schaden zu vermindern oder zu vermeiden, die Wahrscheinlichkeit eines Wiederauftretens zu reduzieren und die Heilung zu fördern“.

#### 2.1.2. Nozizeption

Die Nozizeption ist die Erkennung von noxischen, das heißt potenziell oder tatsächlich gewebeschädigenden Reizen, und die Übermittlung dieser Informationen an das Gehirn. Der Schmerz ist letztendlich die Wahrnehmung der sensorischen Erfahrung, die durch solch einen noxischen Stimulus ausgelöst wurde (MUIR and WOOLF 2001). Die Nozizeption umfasst die neuronalen Prozesse, die verantwortlich sind für die Transduktion, Transmission, Modulation, Projektion und Perzeption eines noxischen Reizes (MUIR 2010a). Dieser kann mechanischer, thermischer oder chemischer Natur sein (MEYER et al. 2006).

Noxische Reize aktivieren spezielle Rezeptoren, die Nozizeptoren. Dies sind spezialisierte afferente, sensorische Nervenendigungen, die sich in fast jedem Gewebe des Körpers befinden. Die meisten von ihnen sind polymodal und werden von verschiedenen Reizen aktiviert. Andere sind unimodal und reagieren nur auf thermische oder mechanische Stimuli (MUIR and WOOLF 2001, MEYER et al. 2006). Im Zuge der Transduktion werden solche Reize in elektrische Signale umgewandelt. Während der Transmission werden diese elektrischen Signale in Form von Aktionspotentialen mittels afferenter Nervenfasern zum Rückenmark geleitet (MUIR 2010a). Diese Nervenfasern haben ihre Zellkörper im Hinterwurzelganglion (Dorsal Root Ganglion, DRG), welches im Foramen intervertebrale des

Wirbelkanals liegt. Sie sind entweder schwach myelinisiert (A-delta Fasern) oder sie besitzen gar keine Myelinscheide (C Fasern) (MUIR and WOOLF 2001). Die A-delta Nervenfasern übermitteln elektrische Signale schneller als die C Nervenfasern und sind verantwortlich für den sofort einsetzenden, scharfen Erstschmerz. Die Aktivierung von C Fasern führt zu einem langsamer einsetzenden, dumpfen, brennenden Schmerz (MEYER et al. 2006, MATHEWS et al. 2014).

Die primären afferenten Nervenfasern erreichen über die Dorsalwurzel des Spinalnerven das Rückenmark. Im Dorsalhorn gehen sie synaptische Verbindungen zu Neuronen zweiter Ordnung ein (MUIR and WOOLF 2001, JULIUS and MCCLESKEY 2006). Dies sind unter anderem Projektionszellen, deren Axone in der weißen Substanz Informationen an das Gehirn weiterleiten und Interneurone, deren Axone im Rückenmark verbleiben und an somatischen und vegetativen Reflexbögen beteiligt sind (CARSTENS and MOBERG 2000). Die Interneurone können in zwei Gruppen eingeteilt werden: hemmende Zellen, die vor allem GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) und/oder Glycin als Transmittersubstanzen verwenden und erregende Interneurone, mit dem Neurotransmitter Glutamat (TODD and KOERBER 2006). Das nozizeptive Signal wird auf seinem Weg durch das Rückenmark durch Interneurone, absteigende Informationen aus dem Gehirn und weiterem, afferenten Input aus der Peripherie moduliert (DAGLISH and MAMA 2016). Die Schmerzinformationen verlaufen schließlich mit den Projektionszellen zweiter Ordnung entlang des Rückenmarks als aufsteigende Bahnen weiter zum Hirnstamm und zum Thalamus (DOSTROVSKY and CRAIG 2006). Der Thalamus verarbeitet und übermittelt Informationen zum somatosensorischen Kortex, der wiederum die Signale an weitere Zentren des Gehirns, wie dem limbischen System, weiterleitet (MUIR and WOOLF 2001). Im Kortex erfolgt die bewusste Schmerzwahrnehmung, die Perzeption (MATHEWS et al. 2014).

### **2.1.3. Auswirkungen von Schmerz auf den Organismus**

#### **2.1.3.1. Die Stressantwort**

Schmerz verursacht Stress (MUIR and WOOLF 2001). Stress ist die biologische Antwort eines Tieres auf einen Stressor, der eine Gefährdung der Homöostase seines Körpers darstellt. Stressoren, wie noxische Reize, aktivieren im Körper Abwehrmechanismen, die auf neuroendokriner, metabolischer, immunologischer und verhaltensbiologischer Ebene sowie im autonomen Nervensystem wirken, mit dem Ziel, die Homöostase wiederherzustellen

(CARSTENS and MOBERG 2000, MUIR 2013). Die Aktivierung dieser Abwehrmechanismen bezeichnet man als Stressantwort. Die beiden Hauptmechanismen sind dabei die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse) und die Sympathikus-Nebennierenmark-Achse (SN-Achse) (GUNNAR and QUEVEDO 2007).

Da die meisten Stressoren nur kurzzeitig wirken, sind sie leicht zu bewältigen und haben keinen signifikanten Einfluss auf das Allgemeinbefinden des Tieres. Ist der Stressor jedoch sehr stark, von langer Dauer oder es kommen mehrere Stressoren zusammen, kommt es zum Disstress. Das Tier ist nicht mehr in der Lage, sich dem Stress anzupassen. Dabei ist der körperliche Aufwand, der benötigt wird, um den Stressor zu bewältigen, so groß, dass biologische Funktionen, die für das Wohlbefinden des Tieres wichtig sind, negativ beeinflusst werden (CARSTENS and MOBERG 2000, MUIR 2010b).

### **2.1.3.2. Die Sympathikus-Nebennierenmark-Achse**

Die Sympathikus-Nebennierenmark-Achse (SN-Achse) ist eine Komponente des sympathischen Nervensystems und führt an ihrem Ende zu einer Ausschüttung von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark (GUNNAR and QUEVEDO 2007). Die Aktivierung des Sympathikus beginnt im Gehirn. Der Locus coeruleus ist ein Gebiet noradrenerger Neurone. Bei Stress kommt es hier zu einer vermehrten Ausschüttung von Noradrenalin. Die noradrenergen Neurone projizieren zum Hypothalamus, der wiederum präganglionäre Zellgruppen des Sympathikus im Rückenmark stimuliert (CHARNEY et al. 1998a). Durch die präganglionären sympathischen Nervenfasern werden im Nebennierenmark sekretorische Zellen aktiviert, die die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin ausschütten, wobei Adrenalin den größten Teil ausmacht. Adrenalin und Noradrenalin gelangen in die Zirkulation und binden an adrenerge Rezeptoren in zahlreichen Organen. Sie bewirken unter anderem eine Erhöhung der Herzfrequenz und des Herzschlagvolumens, eine Vasodilatation in der Muskulatur bei gleichzeitiger Vasokonstriktion in Haut und Darm. Das Ziel ist eine vermehrte Sauerstoffversorgung von Muskeln, Herz und Gehirn. Gleichzeitig wird die Glukoneogenese in der Leber stimuliert, um Glukose im Blut bereitzustellen (GUNNAR and QUEVEDO 2007). Diese Alarmbereitschaft des Körpers mit dem Anstieg von Adrenalin im Blut und seinen beschriebenen Wirkungen wird auch als Kampf- oder Fluchtreaktion bezeichnet (fight-or-flight response) (CANNON 1929).

### **2.1.3.3. Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse**

Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse) ist eine neuroendokrine Kaskade, bei der es vom Hypothalamus ausgehend, letztendlich zur Freisetzung von Kortisol aus der Nebennierenrinde kommt (GUNNAR and QUEVEDO 2007). Der Hypothalamus ist ein Teil des Zwischenhirns. Er besitzt wichtige regulatorische Aufgaben und kontrolliert unter anderem die Körpertemperatur, den Sexualtrieb und die neuroendokrine Stressantwort. Gleichzeitig ist er ein bedeutender Teil des autonomen Nervensystems. Viele Nervenansammlungen (Kerne, Nuclei) innerhalb dieser komplexen Struktur erfüllen die genannten Funktionen (HURCOMBE 2011). Er erhält Informationen aus anderen Hirnarealen wie dem Thalamus oder dem limbischen System. Diese afferenten Impulse führen zur Aktivierung seiner neurosekretorischen Nervenzellen (AGUILERA 1994). Die mit ihm in Verbindung stehende Hypophyse lässt sich in einen Hypophysenvorderlappen (Adenohypophyse) und einen Hypophysenhinterlappen (Neurohypophyse) einteilen (SCHOTT 2002).

Magnozellige (großzellige) Neurone im Nucleus paraventricularis und supraopticus des Hypothalamus synthetisieren Oxytocin und das antidiuretische Hormon (ADH, Vasopressin), welche über Axone direkt in die Neurohypophyse transportiert und dort gespeichert werden. Parvozelluläre (kleinzellige) Neurone in verschiedenen Nuclei produzieren Steuerungshormone, die über ein hypothalamo-hypophysäres Pfortadersystem zur Adenohypophyse gelangen, um dort die Ausschüttung hypophysärer Hormone zu kontrollieren (HURCOMBE 2011). Zu diesen hypothalamischen Steuerungshormonen gehört das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH), welches in parvozellulären Neuronen des Nucleus paraventricularis gebildet wird. Auch ADH stammt zum Teil aus diesen Zellen und kann so auch im Hypophysenvorderlappen wirken (AGUILERA 1994, ALEXANDER et al. 1996).

CRH und ADH induzieren in der Adenohypophyse die Sekretion des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) (BUCKINGHAM 1985, REDEKOPP et al. 1986, LIVESEY et al. 1988). Bei Ratten und Primaten ist das CRH der Hauptstimulator für die ACTH-Ausschüttung (AGUILERA 1994). Anders ist es beim Pferd, wo wahrscheinlich ADH das primäre Signal für die unmittelbare Freisetzung von ACTH darstellt (ALEXANDER et al. 1996, SCHOTT 2002). REDEKOPP et al. (1986) konnten bei Pferden in Ruhe einen engen zeitlichen Zusammenhang zwischen dem Sekretionsmuster von ADH und ACTH nachweisen. Das CRH wirkt zwar alleine auch stimulierend, in seiner Rolle als Sekretagogum potenziert es einigen Autoren nach aber eher die Wirkung von ADH (ALEXANDER et al. 1996, SCHOTT 2002).

Das ACTH gelangt über das Blut zur Nebennierenrinde. Dort wirkt es an den Zellen der Zona fasciculata und induziert die Synthese und Freisetzung von Kortisol (SCHOTT 2002). Kortisol gehört zu der Gruppe der Glukokortikoide und ist der wichtigste Vertreter dieser Gruppe. Aus der Nebennierenrinde gelangt es ins Blut, wo es beim Pferd zu ca. 90 % an die Proteine Cortisol-binding globulin (CBG) und Albumin gebunden wird. Das freie, ungebundene Kortisol ist biologisch wirksam und bindet an Steroidrezeptoren, durch die es seine systemischen Effekte vermittelt (HART et al. 2016). Kortisol stimuliert die Glukoneogenese, verstärkt die Proteolyse und sensibilisiert das Fettgewebe für die Aktivität lipolytischer Hormone (WEISSMAN 1990). Die durch dieses Hormon verursachten katabolen Stoffwechselfvorgänge in Leber, Muskeln und Fett dienen der Mobilisation von Energieträgern und der Glukosebereitstellung, damit die Stresssituation bewältigt werden kann (HEGAB and WEI 2014). Zusätzlich wirkt es immunsupprimierend und entzündungshemmend und verhindert so eine Überreaktion des Körpers auf Stress (WEISSMAN 1990, TENNANT 2013b).

Gleichzeitig inhibiert Kortisol über einen negativen Feedbackmechanismus die ACTH-Sekretion aus der Hypophyse sowie die CRH- und ADH-Ausschüttung aus dem Hypothalamus, indem es an dort sitzenden Glukokortikoidrezeptoren wirkt (BUCKINGHAM 1985, LIVESEY et al. 1988).

#### **2.1.3.4. Auswirkungen von Schmerz auf das Verhalten**

Die Schmerzwahrnehmung erfolgt im Gehirn, wo Informationen unter anderem an den somatosensorischen Kortex, das limbische System und den Locus coeruleus geleitet werden (MUIR and WOOLF 2001). Das limbische System umfasst mehrere Gehirnregionen wie den Hippocampus und die Amygdala. Es ist das Zentrum für Emotionen, Triebe, Gedächtnis und Lernen (CHARNEY et al. 1998b). Die Aktivierung all dieser Gehirnregionen führt zu Verhaltensänderungen und adaptiven Reaktionen (MUIR 2010b).

Auch das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) ist nicht nur Teil der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, sondern wirkt ebenfalls als exzitatorischer Neurotransmitter im Gehirn. Im Locus coeruleus kommt es durch CRH zum Beispiel zu einer vermehrten Freisetzung von Noradrenalin und einer daraus resultierenden verstärkten Angstreaktion und Erregung. Erhöhte Konzentrationen von CRH in der Amygdala führen zu einem verminderten Erkundungsverhalten (CHARNEY et al. 1998b, MUIR 2010b).

## 2.2. Schmerzbeurteilung beim Pferd

Anders als Menschen, sind Tiere nicht in der Lage, uns ihr Empfinden mitzuteilen. Es kann daher schwierig sein, ihre Schmerzen zu erkennen und zu quantifizieren (HART 2012). Zudem ist die direkte Messung einer subjektiven Erfahrung wie Schmerz nicht möglich. Die Schmerzbeurteilung erfolgt daher durch die Beobachtung des Verhaltens und die Erfassung klinischer und hormoneller Parameter, die durch die Stressantwort beeinflusst werden (MOLONY and KENT 1997, SRITHUNYARAT et al. 2017).

### 2.2.1. Verhalten

Um Schmerzverhalten feststellen zu können, ist es wichtig, das speziesspezifische Verhalten des Pferdes zu kennen. Es gibt allgemeine Verhaltensweisen, die auf Schmerz hindeuten können. Diese sind jedoch unspezifisch und können weder die genaue Quelle und die Art des Schmerzes definieren, noch korrelieren sie streng mit der Schmerzintensität (ASHLEY et al. 2005). Zu ihnen gehören eine verminderte Aktivität des Pferdes bis hin zu Bewegungsunwillen, eine gesenkte Kopf-Hals-Haltung, dagegen aber auch Ruhelosigkeit, Aufregung, Aggression oder Widerwillen im Umgang mit dem Menschen (CARSTENS and MOBERG 2000, PRICE et al. 2003, PRITCHETT et al. 2003, ASHLEY et al. 2005, DALLA COSTA et al. 2014).

Daneben gibt es spezifische Verhaltensweisen, die bei Schmerz in einer bestimmten Körperregion gezeigt werden (ASHLEY et al. 2005). Pferde mit beispielsweise abdominalem Schmerz (Kolik) können Anzeichen zeigen wie Appetitlosigkeit, Flehmen, Scharren, Hinlegen, Wälzen, Sich-gegen-den-Bauch treten oder Zur-Flanke-schauen (TAYLOR et al. 2002, PRITCHETT et al. 2003, GRAUBNER et al. 2011). Bei Schmerzen im Bereich der Gliedmaßen oder der Hufe zeigen Pferde oft eine abnormale Gewichtsverlagerung, die Entlastung einer Gliedmaße im Stand, Lahmheit oder sie lassen sich die kontralaterale Gliedmaße nicht aufheben (OBEL 1948, BUSSIÈRES et al. 2008, DUTTON et al. 2009).

Auch können Pferde Schmerzen durch ihre Mimik ausdrücken. Das Schmerzgesicht äußert sich zum Beispiel in zurückgehaltenen, leicht nach außen gedrehten Ohren, einem stumpfen, abwesenden Blick, verengten Augen und Spannung der Muskulatur über den Augen, sodass die Form des oberen Augenlids gewinkelt erscheint. Weitere Anzeichen sind eine angespannte Kaumuskelatur, wobei die Zähne aufeinander gepresst werden können, angespannte, leicht erweiterte und zurückgezogene Nüstern sowie eine nach hinten gezogenen Oberlippe mit angespannter Maulspalte (DALLA COSTA et al. 2014, GLEERUP et al. 2015).

Bei der Schmerzbeurteilung durch das Beobachten von Verhalten bleibt zu beachten, dass die Wahrnehmung und der Ausdruck von Schmerz individuell unterschiedlich und von Faktoren wie Spezies, Rasse oder Umwelteinflüssen abhängig sind (TAYLOR et al. 2002, BUSSIÈRES et al. 2008). Trotzdem ist bei gründlicher und systematischer Vorgehensweise das Erfassen von Verhaltensänderungen ein sehr gutes Werkzeug für die Einschätzung des Schmerzzustandes beim Pferd (DAGLISH and MAMA 2016).

### **2.2.2. Klinische Parameter**

Schmerz kann durch die Aktivierung des sympathischen Nervensystems zu Veränderungen klinischer Parameter wie einer Erhöhung der Herz- und Atemfrequenz oder dem Blutdruck führen (MOLONY and KENT 1997).

Die Messung der Herzfrequenz wird regelmäßig für die Schmerzbeurteilung beim Pferd verwendet. In verschiedenen Untersuchungen konnte bisher jedoch nur eine moderate Korrelation zwischen der Höhe der Herzfrequenz und der ermittelten Schmerzintensität nachgewiesen werden (BUSSIÈRES et al. 2008, GRAUBNER et al. 2011, VAN LOON et al. 2014). In anderen Studien kam es bei schmerzbelasteten Pferden zu gar keiner Erhöhung der Herzfrequenz (RAEKALLIO et al. 1997a, PRICE et al. 2003). Die Höhe der Atemfrequenz korreliert ebenfalls nur gering- bis mittelgradig mit der Stärke der Schmerzen (GRAUBNER et al. 2011, VAN LOON et al. 2014). Auch bei Hunden sind die Herz- und Atemfrequenz keine nützlichen Indikatoren für Schmerz (HOLTON et al. 1998). Für den Blutdruck hingegen konnten BUSSIÈRES et al. (2008) eine signifikante Korrelation mit der Schmerzintensität bei Pferden nachweisen.

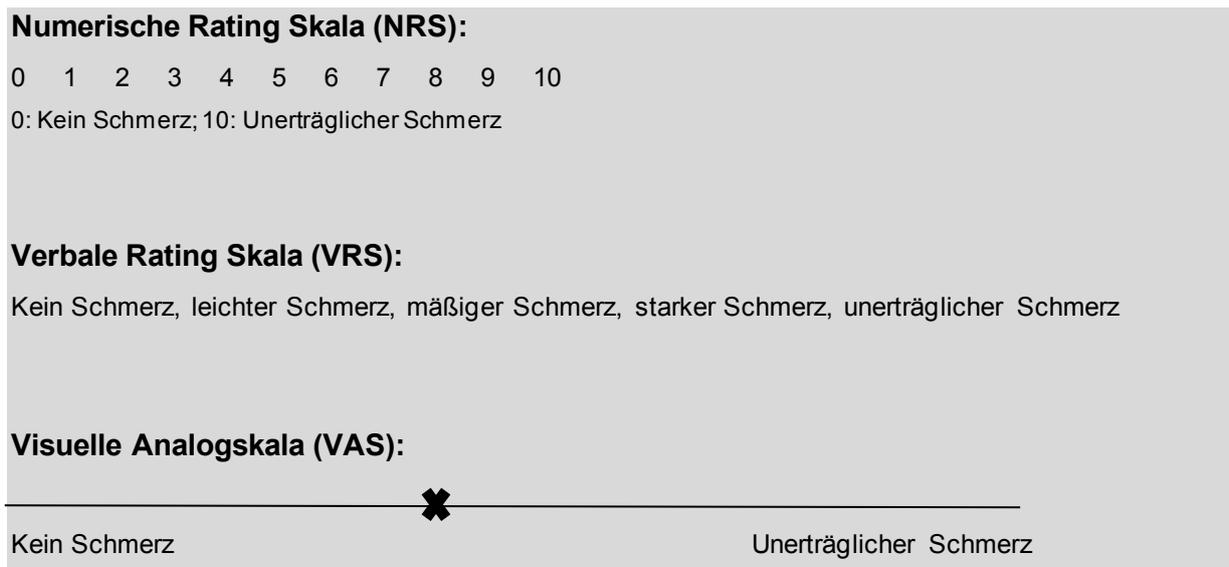
Die alleinige Messung klinischer Parameter zur Identifizierung und Quantifizierung von Schmerz ist nicht ausreichend, da diese auch durch viele andere Faktoren beeinflusst werden. So können zum Beispiel nicht schmerzhafte, aber stressvolle Stimuli oder kardiovaskuläre Anomalien ebenfalls eine Erhöhung der Herzfrequenz zur Folge haben. Die oben genannten Parameter sollten daher besser mit anderen Methoden der Schmerzbeurteilung kombiniert werden, wie es bei vielen Schmerzskaalen der Fall ist (MOLONY and KENT 1997, BUSSIÈRES et al. 2008, GRAUBNER et al. 2011).

### 2.2.3. Schmerzskalen

In der Veterinärmedizin werden verschiedenen Schmerzskalen verwendet, um den Schmerz von Tieren zu messen. Dazu gehören eindimensionale und multidimensionale Skalen (DE GRAUW and VAN LOON 2016). Daneben existieren auch Beurteilungssysteme, die auf Veränderungen von Gesichtsausdrücken basieren (DALLA COSTA et al. 2014, GLEERUP et al. 2015). Ein einheitlicher Goldstandard für die Schmerzbeurteilung fehlt jedoch bisher (DALLA COSTA et al. 2014, MATHEWS et al. 2014).

#### 2.2.3.1. Eindimensionale Schmerzskalen

Zu den eindimensionalen Schmerzskalen gehören die Numerische Rating Skala (NRS), die Verbale Rating Skala (VRS) und die Visuelle Analogskala (VAS) (Abb. 1) (MATHEWS et al. 2014).



**Abb. 1:** Eindimensionale Schmerzbeurteilungsskalen (MATHEWS et al. (2014)).

In der Humanmedizin finden solche eindimensionalen Skalen breite Anwendung, der Patient gibt dabei die Intensität seines Schmerzes in der Regel selbst an (COLL et al. 2004). In der Veterinärmedizin muss der jeweilige Benutzer bei der Verwendung der NRS oder VAS einen subjektiven Wert für die Intensität des bei dem Tier beobachteten Schmerzes angeben. Dabei wird die Beurteilung des Beobachtenden durch seine klinische Erfahrung beeinflusst. Ein hohes Maß an Interobserver-Variabilität muss daher beachtet werden, was die Zuverlässigkeit solcher Skalen limitiert (GRAUBNER et al. 2011, VAN LOON et al. 2014, MATHEWS et al. 2014).

Die Verbale Rating Skala (VRS) ist eine einfache beschreibende Skala und besitzt meist vordefinierte Beschreibungen der Schmerzintensität oder der Schmerzzeichen, denen oft eine Nummer zugeteilt wird (DE GRAUW and VAN LOON 2016). Ein in der Veterinärmedizin häufig angewendetes Beispiel für solch eine Skala ist die der American Association of Equine Practitioners (AAEP) zur Beurteilung der Lahmheit von Pferden. Die Lahmheit wird dabei mit Werten von 0 bis 5 eingestuft. 0 bedeutet, das Pferd ist lahmfrei, 5 steht für die größtmögliche Lahmheit (AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS 1991, WAGNER 2010). Ein weiteres Beispiel ist das Obel Grading System, welches für die Evaluierung der Schmerzintensität von Pferden mit Hufrehe entwickelt wurde (OBEL 1948, VINUELA-FERNANDEZ et al. 2011). Die Skala ist in vier Grade aufgeteilt und kategorisiert die mit der Hufrehe-assoziierte Lahmheit auf der Basis der Intensität der Schmerzzeichen (Tab. 1). Trotz genauer Beschreibungen der einzelnen Grade hängt die Effektivität dieser Skalen auch hier von der Erfahrung des Beobachtenden ab. Sie liefern also nicht unbedingt ein zuverlässigeres Ergebnis als die NRS oder VAS (TAYLOR et al. 2002, VINUELA-FERNANDEZ et al. 2011).

**Tab. 1:** Beschreibung der vier Obel Grade zur Kategorisierung der Hufrehe-assoziierten Lahmheit, angepasst nach STASHAK (1989).

<b>Obel Grad</b>	<b>Beschreibung</b>
1	In Ruhe ständige Gewichtsverlagerung von einem Bein auf das andere. Keine Lahmheit im Schritt, das Pferd zeigt jedoch einen verkürzten, steifen Gang im Trab.
2	Das Pferd läuft bereitwillig im Schritt, jedoch mit einem erkennbar verkürzten und steifen Gang. Eine Gliedmaße kann ohne Probleme aufgehoben werden.
3	Das Pferd bewegt sich nur widerwillig. Eine Gliedmaße lässt sich nur schwer bis gar nicht aufheben.
4	Das Pferd verweigert die Bewegung. Läuft nur, wenn es gezwungen wird.

### **2.2.3.2. Multidimensionale Schmerzskalen**

Neben den eindimensionalen gibt es auch zusammengesetzte, multidimensionale Schmerzskalen. Diese beinhalten Verhaltenskriterien sowie klinische Parameter. Dabei werden die verschiedenen Variablen, die im Sinne einer beschreibenden Skala genau definiert sind, einzeln mit Punkten bewertet. Die Punktzahlen der einzelnen Variablen ergeben am Ende einen Gesamtscore. Da Schmerz ein komplexes Phänomen ist, führt diese Art der

Schmerzbeurteilung zu einer größeren und objektiveren Aussagekraft (DE GRAUW and VAN LOON 2016). Für das Pferd wurden verschiedene multidimensionale Schmerzbeurteilungsskalen entworfen (RAEKALLIO et al. 1997a, BUSSIÈRES et al. 2008, DUTTON et al. 2009, GRAUBNER et al. 2011, DALLA COSTA et al. 2014).

BUSSIÈRES et al. (2008) entwickelten die Composite Pain Scale (CPS), eine multifaktorielle numerische Schmerzskala zur Messung von orthopädischen Schmerzen beim Pferd. Dabei werden klinische Parameter, spontane Verhaltensweisen sowie interaktive Verhaltensantworten auf akustische oder palpatorische Stimuli beurteilt. Jeder Parameter kann mit einer Punktzahl von 0 bis 3 bewertet werden. 0 entspricht dabei dem Normalzustand, 3 steht für die größtmögliche Modifikation des jeweiligen Parameters in Anwesenheit von Schmerz. Mithilfe dieser Skala wurden Pferde mit akuten orthopädischen Schmerzen durch eine chemisch induzierte Synovialitis beurteilt. Die Autoren ermittelten eine geringe Inter- und Intraobserver-Variabilität. Die CPS wurde von VAN LOON et al. (2010, 2014) validiert und erfolgreich für die Messung von akuten viszeralen und somatischen Schmerzen bei Pferden unter Klinikbedingungen eingesetzt.

GRAUBNER et al. (2011) beschrieben die Post Abdominal Surgery Pain Assessment Scale (PASPAS) zur Evaluierung postoperativer Schmerzen bei Pferden nach Laparotomie. Sie wurde bisher jedoch nicht für Pferde mit orthopädischen Schmerzen erweitert. Auch hier werden Verhaltens- und klinische Kriterien für die Schmerzbeurteilung verwendet. Seine Skala beinhaltet jedoch auch den Parameter „allgemein subjektive Bewertung des Schmerzes“, was die Objektivität der Beurteilung verringert (DE GRAUW and VAN LOON 2016).

### **2.2.3.3. Schmerzskalen auf der Basis von Gesichtsausdrücken**

Pferde können Schmerzen auch durch ihre Gesichtsausdrücke äußern (GLEERUP et al. 2015). Schmerzskalen, bei denen der Schmerz anhand feiner Veränderungen der Mimik beurteilt wird, wurden für den Menschen und andere Spezies, darunter auch für das Pferd, entwickelt (LANGFORD et al. 2010, AHOLA KOHUT et al. 2012, DALLA COSTA et al. 2014, HAGER et al. 2017). Das Ziel war es, ein sensitiveres Werkzeug für die Schmerzerkennung zu erhalten, damit auch geringgradige Schmerzen erkannt werden können, die nicht unbedingt durch deutliche schmerzassoziierte Verhaltensweisen gezeigt werden (DE GRAUW and VAN LOON 2016).

DALLA COSTA et al. (2014) entwickelten die Horse Grimace Scale (HGS), mit der die

Schmerzen von Pferden nach Kastration gemessen wurden. Sie beinhaltet Fotos und Erklärungen für sechs verschiedene Einheiten von Gesichtsausdrücken. So wird unter anderem beurteilt, in welchem Maße das Pferd die Ohren zurücklegt oder die Nüstern anspannt. Jeder Gesichtsausdruck wird mit einem Score von 0 bis 2 bewertet. 0 bedeutet, der Ausdruck ist nicht vorhanden, 2 heißt, er ist deutlich zu sehen. In einer darauffolgenden Studie von 2016 verwendeten DALLA COSTA et al. die Horse Grimace Scale zur weiteren Validierung für die Beurteilung der Schmerzintensität bei Pferden mit Hufrehe. Die Gesichtsausdrücke wurden jedoch lediglich anhand von Bildern oder kurzen Videoaufnahmen ausgewertet. Für die Live-Anwendung unter Klinikbedingungen bedarf es nach Ansicht der Autoren weiterer Untersuchungen.

Die von VAN LOON und VAN DIERENDONCK (2015) entworfene Equine Utrecht University Scale for Facial Assessment of Pain (EQUUS-FAP) ist eine Schmerzskala zur Beurteilung akuter abdominaler Schmerzen beim Pferd. Diese Skala enthält neun Parameter, die verschiedene Gesichtsausdrücke beschreiben. Dazu gehören die Ohrposition, die Weite der Nüstern und das Vorhandensein von Flehmen oder Gähnen. Jeder Parameter kann auch hier mit einer Punktzahl von 0 bis 2 bewertet werden, wobei ein Schmerzscore von 0 (keine Anzeichen von Schmerz) bis 18 (maximaler Schmerzscore) erreicht werden kann. Die EQUUS-FAP wurde 2016 von VAN DIERENDONCK und VAN LOON an weiteren Kolikern angewendet und als verlässliches und reproduzierbares Werkzeug für die Erkennung und Quantifizierung von akuten abdominalen Schmerzen beim Pferd bewertet, welches auch von Pferdebesitzern angewendet werden könnte. Die Beobachtung der Pferde erfolgte dabei direkt und nicht anhand von Videoaufnahmen. In einer darauffolgenden Studie von 2017 validierten die Autoren die EQUUS-FAP für die Anwendung bei akuten und post-operativen Schmerzen im Bereich des Kopfes (VAN LOON and VAN DIERENDONCK 2017).

#### **2.2.4. ACTH und Kortisol als Schmerzparameter**

Schmerz führt zu einer Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse) (MOLONY and KENT 1997, HART 2012, TENNANT 2013b). Bei Ratten kommt es 10 bis 15 Sekunden nach einem schmerzhaften Stimulus zu einer Erhöhung der ACTH-Konzentrationen im Blut (BELYAKOVA and MENDZHERITSKII 2006). Kortisol steht am Ende dieser neuroendokrinen Kaskade und seine Blutkonzentration wird bei schmerzhaften Zuständen häufig mit dem Ziel gemessen, die Schmerzen objektiver beurteilen zu können (MELLOR et al. 1991, MOLONY and KENT 1997).

In verschiedenen Untersuchungen an Pferden fanden die Autoren eine signifikante Korrelation zwischen dem Grad des Schmerzes und der Kortisolkonzentration im Blut. Je höher die Schmerzintensität, desto größer war der Kortisolanstieg (MAY 2007, BUSSIÈRES et al. 2008). FELDSEIN et al. (2010) beschrieben ebenfalls erhöhte Kortisolkonzentrationen bei lahmen Hunden mit experimentell induzierter Synovialitis. Auch die Kastration von Schaflämmern führte zu einem signifikanten Anstieg von Kortisol (MELLOR et al. 1991, MELLOR et al. 2002).

Andere Studien zeigten hingegen keine erhöhten Serum-Kortisolwerte bei Pferden mit durch Hufrehe bedingten Schmerzen (RIETMANN et al. 2004a) oder mit postoperativen Schmerzen nach Arthroskopie (RAEKALLIO et al. 1997a). Bei Hunden mit traumatischen Knochenfrakturen waren die Kortisolkonzentrationen sogar niedriger als bei gesunden Kontrolltieren, obwohl die Tiere mit Frakturen signifikant höhere Schmerzscores aufwiesen (SRITHUNYARAT et al. 2017). TENNANT (2012, 2013b) beschrieb für den Menschen, dass nur bei hochgradigen Schmerzen die HHN-Achse in dem Maße stimuliert wird und die ACTH- sowie die Kortisolausschüttung so stark ansteigt, dass die Blutwerte messbar über dem Referenzbereich liegen.

Die Dauer des Schmerzes hat dazu Einfluss auf die Ausschüttung der Stresshormone. Der Literatur zufolge können bei chronischem Stress und Schmerz die Hormonkonzentrationen steigen oder abfallen (STRITTMATTER et al. 2005, DICKENS and ROMERO 2013, PAWLUSKI et al. 2017). Bei andauernder exzessiver Stimulation der HHN-Achse könnten Reserven aufgebraucht werden und so die Hormonspiegel im Blut sinken (TENNANT and HERMANN 2002, RIETMANN et al. 2004a, MUHTZ et al. 2013). LEY et al. (1991) untersuchten die Kortisolwerte im Blut chronisch lahmer Schafe. Diejenigen Schafe, die seit einer Woche an einer Fußfäule mit einhergehender hochgradiger Lahmheit litten, hatten signifikant niedrigere Kortisolwerte als gesunde Kontrolltiere. Dies stimmt mit den Ergebnissen von MILLS et al. (1997) überein, wonach chronische Entzündungen die Kortisolkonzentrationen im Blut von Pferden senken. In einer weiteren Untersuchung von LEY et al. (1994) an einer größeren Anzahl von seit mindestens vier Wochen lang lahmen Schafen, konnten dagegen bei allen lahmen Tieren signifikant höhere Kortisolwerte im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren gemessen werden. TENNANT (2017) beschrieb erhöhte, erniedrigte und im Referenzbereich liegende ACTH-Werte bei Menschen mit starken, seit mindesten fünf Jahren andauernden chronischen Schmerzen. Nach MILLS et al. (1997) könnten die unterschiedlichen Hormonspiegel bei chronischen Schmerz- oder Stresszuständen von der Spezies oder der Art des Stimulus abhängen.

Neben dem Schmerz gibt es viele weitere Faktoren, die zu Veränderungen der ACTH-

und/oder Kortisolkonzentrationen im Blut führen können. Endokrine Messungen zur Schmerzbeurteilung könnten so eventuell eine Stressantwort widerspiegeln, die nicht nur schmerzinduziert ist (DE GRAUW and VAN LOON 2016). Systemische Störungen wie akute abdominale Erkrankungen oder Sepsis aktivieren die HHN-Achse (PRITTIE et al. 2002, GOLD et al. 2007, MARTIN et al. 2008). GOLD et al. (2007) fanden stark erhöhte ACTH-Werte bei septischen Fohlen im Vergleich zu gleichaltrigen gesunden Fohlen. In mehreren Untersuchungen hatten Pferde mit Kolik erhöhte ACTH- und Kortisolwerte. Mehr noch korrelierte der Schweregrad der Kolik mit dem Anstieg der ACTH- und Kortisolkonzentrationen im Blut (HINCHCLIFF et al. 2005, NIINISTÖ et al. 2010, AYALA et al. 2012, MAIR et al. 2014). Eine Kolik kann zu einer Endotoxämie oder kardiovaskulären Störungen führen, was durch den körperlichen Stress die HHN-Achse aktiviert. Daneben gehen Koliken oft auch mit einem erheblichen Maß an Schmerzen einher (MAIR et al. 2014). Inwieweit die Erhöhung der Stresshormone bei Pferden mit Kolik durch den Schmerz oder durch den Stress infolge der systemischen Erkrankung verursacht wird, ist schwierig zu bestimmen (NIINISTÖ et al. 2010).

Verschiedene psychische und physische Stimuli sind ebenfalls Stressoren wie zum Beispiel der Transport im Pferdeanhänger (FAZIO et al. 2008), körperliche Belastung im Training oder auf dem Laufband (ALEXANDER et al. 1991, KUROSAWA et al. 1998) sowie eine neue Umgebung (HADA et al. 2003). Solche Stressoren können eine akute Stressantwort beim Pferd auslösen und zu einer Erhöhung der ACTH- und Kortisolwerte im Blut führen. Auch eine Hypoglykämie führt zu einer Aktivierung der HHN-Achse (ALEXANDER et al. 1996).

Bei der Messung der Stresshormone zur Schmerzbeurteilung ist außerdem zu beachten, dass diese nicht konstant freigesetzt werden. Beim Pferd sowie bei vielen anderen Spezies unterliegt die Ausschüttung von Kortisol einem zirkadianen Rhythmus, mit den höchsten Werten am frühen Morgen (LARSSON et al. 1979, ALEXANDER et al. 1996, CORDERO et al. 2012). Für ACTH konnten geringe Veränderungen der Sekretion über den Tag festgestellt werden, die aber keinem festen Rhythmus folgten (LEE et al. 2010, CORDERO et al. 2012, DIEZ DE CASTRO et al. 2014). RENDLE et al. (2014) beschrieben dagegen tagesrhythmische Schwankungen der ACTH-Sekretion. Da diese aber sehr gering waren, vermuteten sie keine klinische Relevanz bei der Interpretation der gemessenen Werte. Bewiesen ist jedoch, dass das ACTH jahreszeitlichen Schwankungen unterliegt. DONALDSON et al. (2005) beschrieben als Erste eine Erhöhung der ACTH-Werte gesunder Pferde und Ponys im September, verglichen mit Januar und Mai. Sie schlossen daraus, dass die Aktivität der Hypophyse und damit auch die ACTH-Sekretion einer Jahresrhythmik unterliegen. In darauffolgenden Studien konnte bestätigt werden, dass die Sekretion bestimmter Peptide der Hypophyse mit kürzer werdender Tageslänge zunimmt. Es kommt daher zu höheren Plasma-ACTH-Werten in den

Monaten August, September und Oktober (BEECH et al. 2009, COPAS and DURHAM 2012). Für Kortisol konnten HARITOU et al. (2008) sowie PLACE et al. (2010) hingegen keine jahreszeitlichen Schwankungen feststellen. In einer darauffolgenden Untersuchung wurden dagegen erhöhte Werte im Mai gemessen (CORDERO et al. 2012).

Zusammenfassend ist die Aussagekraft einer Messung des ACTH- und/oder Kortisolwertes zur Schmerzerkennung oder zur Bestimmung der Schmerzintensität beim Tier limitiert und sollte nicht als alleiniger Parameter für Schmerz verwendet werden (TAYLOR et al. 2002, HART 2012, DE GRAUW and VAN LOON 2016, SRITHUNYARAT et al. 2017). Dazu macht die Bearbeitungszeit der Proben eine unmittelbare Schmerzbeurteilung unter Klinikbedingungen unmöglich. Ob und inwieweit es bei Pferden mit Schmerzen zu einem Anstieg der ACTH- und Kortisolkonzentrationen kommt, ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

## **2.3. Pituitary Pars Intermedia Dysfunction**

### **2.3.1. Prävalenz und Epidemiologie**

Die Pituitary Pars Intermedia Dysfunction (PPID), auch als Equines Cushing Syndrom (ECS) bezeichnet, ist eine endokrine Erkrankung, die auf einer Dysfunktion der Pars intermedia der Hypophyse beruht. Die Erkrankung betrifft vor allem ältere Tiere, mit einem durchschnittlichen Alter von 18 - 23 Jahren (VAN DER KOLK et al. 1993, FRANK et al. 2006a, MCFARLANE 2011, GEHLEN and BRADARIC 2013a). Die Prävalenz der Erkrankung liegt nach MCGOWAN et al. (2013b) für Pferde  $\geq 15$  Jahren bei 21,2 %. Die Wahrscheinlichkeit an PPID zu erkranken, nimmt dabei mit dem Alter zu (MCGOWAN et al. 2013b). Es können jedoch auch jüngere Tiere betroffen sein. So gibt es Fallberichte von erkrankten Pferden unter zehn Jahren. Das jüngste beschriebene Pferd hatte dabei ein Alter von sieben Jahren (EVANS 1972, ORTH et al. 1982a, HEINRICHS et al. 1990). Eine Geschlechtsprädisposition scheint es nicht zu geben. Auch sind Pferde sowie Ponys gleichermaßen von der Erkrankung betroffen (GEHLEN and BRADARIC 2013a, MCGOWAN et al. 2013b).

### **2.3.2. Physiologie der equinen Hypophyse**

Die Hypophyse ist eine endokrine Drüse, die eine zentrale Rolle in der Regulation des Hormonsystems spielt. Sie besteht aus der Adenohypophyse (Hypophysenvorderlappen) und

der Neurohypophyse (Hypophysenhinterlappen) (NICHEL et al. 2004). Die Bezeichnungen Vorder- und Hinterlappen sind beim Pferd jedoch irreführend, da die Adenohypophyse nicht direkt rostral liegt, sondern mehr die Neurohypophyse umfasst (SCHOTT 2002, NICHEL et al. 2004). Die Neurohypophyse setzt sich zusammen aus dem Infundibulum (Hypophysenstiel), mit der sie am Hypothalamus befestigt ist, und der Pars distalis neurohypophys. Sie steht durch Axone mit hypothalamischen Kerngebieten, dem Nucleus supraopticus und dem Nucleus paraventricularis, in Verbindung (LIEBICH 2004, NICHEL et al. 2004). Über diese Verbindungen gelangen die in den Kernen des Hypothalamus synthetisierten Hormone als Neurosekret in die Neurohypophyse. Dabei handelt es sich um ADH (antidiuretisches Hormon, Vasopressin) und Oxytocin. In der Neurohypophyse werden diese Hormone gespeichert und in die Blutbahn freigesetzt (NICHEL et al. 2004).

Die Adenohypophyse wiederum ist aufgeteilt in eine Pars distalis, eine Pars tuberalis und eine Pars intermedia. Die Pars distalis besteht aus unterschiedlichen Typen von Endokrinozyten, die der Kontrolle durch Steuerungshormone aus dem Hypothalamus unterliegen und verschiedene Hormone sezernieren (Tab. 2) (LIEBICH 2004).

**Tab. 2:** Die verschiedenen Zelltypen der Pars distalis und ihre Hormone.

<b>Zelltyp</b>	<b>Sezerniertes Hormon</b>
Somatotrope Zellen	Somatotropes Hormon (STH)
Luteotrope Zellen	Prolaktin (PRL) & Luteotropes Hormon (LTH)
Gonadotrope Zellen	Luteinisierendes Hormon (LH) & Follikelstimulierendes Hormon (FSH)
Thyreotrope Zellen	Thyrotropin oder Thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH)
Kortikotrope Zellen	Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) & $\beta$ -Lipotropin ( $\beta$ -LPH)

Die Pars tuberalis enthält als Fortsatz der Adenohypophyse, der das Infundibulum umfasst, dichte Kapillarknäuel, die Kontakt mit Neuronen aus dem Hypothalamus haben. In diese ersten Kapillaren werden Steuerungshormone abgegeben und gelangen durch venöse Abflüsse in ein zweites Kapillargebiet in der Pars distalis. Hier können die Steuerungshormone des Hypothalamus an den Endokrinozyten der Pars distalis wirksam werden (LIEBICH 2004).

Die Pars intermedia des Hypophysenvorderlappens besteht aus einem einzigen Zelltyp, den melanotropen Zellen (MCFARLANE 2011). Diese melanotropen Zellen der Pars intermedia sowie auch die kortikotropen Zellen der Pars distalis produzieren beide zunächst das gleiche Vorläuferprotein Proopiomelanocortin (POMC). Daraus entstehen durch proteolytische

Spaltung, katalysiert durch die Prohormon Convertasen 1 und 2 (PC 1, PC 2), die Endprodukte. Die kortikotropen Zellen exprimieren ausschließlich die PC 1, die melanotropen Zellen PC 1 und PC 2. In der Pars distalis kommt es zur Spaltung von POMC in ACTH,  $\beta$ -Lipotropin und einem N-terminalen Fragment. In der Pars intermedia wird POMC durch die zwei Prohormon Convertasen in kleinere Peptide prozessiert. Dabei entstehen aus ACTH das  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierende Hormon ( $\alpha$ -MSH) und das Corticotropin-like intermediate lobe peptide (CLIP).  $\beta$ -Lipotropin wird weiter gespalten zu  $\gamma$ -Lipotropin und  $\beta$ -Endorphin. Das N-terminale POMC wird zu  $\gamma$ -MSH (KLAMMER 2007, MCFARLANE 2011, WARDLAW 2011). ACTH wird in den melanotropen Zellen durch die PC 2 also weiter gespalten in  $\alpha$ -MSH und CLIP. Die ACTH-Ausschüttung erfolgt bei gesunden Pferden daher fast ausschließlich aus der Pars distalis (GREER et al. 1975, WILSON et al. 1982).

Das ACTH gelangt über das Blut zur Nebennierenrinde und stimuliert dort die Sekretion von Kortisol (SCHOTT 2002). Kortisol wiederum hemmt über einen negativen Feedbackmechanismus die ACTH-Sekretion in der Pars distalis, indem es an dort sitzenden Glukokortikoidrezeptoren wirkt. Anders als die Zellen der Pars distalis besitzen die der Pars intermedia jedoch keine solcher Rezeptoren, sie unterliegen also keinem negativen Feedbackmechanismus durch Kortisol (ANTAKLY and EISEN 1984). Die Inhibition der Pars intermedia erfolgt durch Dopamin (MCFARLANE 2006). Die melanotropen Zellen haben direkten synaptischen Kontakt zu dopaminergen Neuronen, deren Ursprünge hauptsächlich im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus liegen (GOUDREAU et al. 1992, SALAND 2001). Das Dopamin bindet am Dopamin D2-Rezeptor der melanotropen Zellen und inhibiert so die Transkription und Translation von POMC sowie die Ausschüttung von POMC-Spaltprodukten (MCFARLANE 2006). ORTH et al. (1982a) konnten nachweisen, dass sich nach systemischer Gabe von Dopamin oder Dopamin-Agonisten bei Pferden die Konzentration von POMC-Spaltprodukten im Plasma reduziert.

### **2.3.3. Pathogenese der PPID**

Bei der PPID handelt es sich um eine langsam fortschreitende, neurodegenerative Erkrankung. Dabei kommt es zu einer Degeneration der dopaminergen Neuronen aus dem Hypothalamus und somit zu einer Störung der hemmenden Einflüsse auf die melanotropen Zellen der Pars intermedia der Hypophyse (MCFARLANE et al. 2005b). Die exakte Pathogenese ist noch nicht abschließend geklärt. Vieles deutet aber darauf hin, dass oxidativer Stress eine wichtige Rolle bei der Neurodegeneration spielt (MCFARLANE et al. 2003, MCFARLANE 2011). Bei oxidativem Stress werden durch freie Radikale

Zellbestandteile geschädigt. Chronische oxidative Schädigungen können durch das Vorhandensein von durch Oxidation modifizierten Proteinen nachgewiesen werden. Ein Beispiel für einen solchen Marker ist das 3-Nitrotyrosin, welches durch die Nitrierung der Aminosäure Tyrosin entsteht (MCFARLANE et al. 2005b). MCFARLANE et al. (2005b) fanden in den dopaminergen Nervenenden der Pars intermedia bei Pferden mit PPID mehr als doppelt so hohe 3-Nitrotyrosinwerte wie bei gleichaltrigen Kontrolltieren. Im Vergleich zu jüngeren Kontrolltieren war dieser Marker sogar um mehr als das 15-fache erhöht. Auch konnten sie bei gesunden Tieren eine altersbedingte Ansammlung dieses oxidativen Stressmarkers nachweisen, was zu dem beobachteten erhöhten Erkrankungsrisiko bei älteren Tieren beitragen könnte (MCGOWAN et al. 2013b). Die systemische antioxidative Kapazität scheint bei Pferden mit PPID hingegen nicht beeinträchtigt zu sein (MCFARLANE and CRIBB 2005a).

Auch eine Akkumulation falsch gefalteter Proteine in den dopaminergen Neuronen der Pars intermedia trägt wahrscheinlich zu der Neurodegeneration mit bei (MCFARLANE et al. 2005b).  $\alpha$ -Synuclein ist ein ungefaltetes, monomeres Protein, welches in Leukozyten und Nervenenden vorkommt. Unter bestimmten Bedingungen wie zum Beispiel erhöhter Produktion oder posttranslationaler Modifikation, wie Oxidation oder Nitrierung, kann dieses Protein falsch gefaltet werden und unlösliche Proteinaggregate bilden. Diese stören die Zellfunktionen bis hin zum Zelltod (MCFARLANE 2011). Bei Menschen mit Parkinson, einer ebenfalls altersbedingten, neurodegenerativen Erkrankung, kommt es zu einer Ansammlung von  $\alpha$ -Synuclein im Gehirn (CHIBA-FALEK et al. 2006). Auch bei Pferden mit PPID konnten MCFARLANE et al. (2005b) erhöhte Konzentrationen in der Pars intermedia nachweisen.

Durch die Degeneration der dopaminergen Neuronen kommt es zu einer verringerten Ausschüttung von Dopamin. MILLINGTON et al. (1988) wiesen verminderte Dopaminkonzentrationen in Geweben der Pars intermedia von Pferden mit PPID im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrolltieren nach. Die so herabgesetzte Hemmung auf die melanotropen Zellen führt zu einer Hyperplasie und Hypertrophie dieser Gewebsstrukturen, bis hin zur Bildung von Mikro- bzw. Makroadenomen (SAIARDI and BORRELLI 1998, MILLER et al. 2008). In fortgeschrittenen Fällen kann es durch große Adenome zu einer Kompression angrenzender Bereiche der Hypophyse kommen, die dadurch atrophieren können (HEINRICHS et al. 1990, VAN DER KOLK et al. 1993, OKADA et al. 1997). Aufgrund der fehlenden Inhibition kommt es neben der Hyperplasie außerdem zu einer vermehrten Produktion von POMC und der POMC-Spaltprodukte (ORTH et al. 1982a, MILLINGTON et al. 1988). HEINRICHS et al. (1990) konnten immunocytochemisch erhöhte Werte von POMC und seinen Spaltprodukten  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -Endorphin und ACTH in Adenomen der Pars intermedia darstellen. CARMALT et al. (2018) wiesen eine verstärkte POMC mRNA Expression in der

Hypophyse von Pferden mit PPID nach. Auch im Blut kommt es zu einem Anstieg von ACTH,  $\alpha$ -MSH und  $\beta$ -Endorphin, wobei der Anstieg von ACTH im Verhältnis am geringsten ist (WILSON et al. 1982, SCHOTT 2002). Pferde mit PPID zeigen trotzdem erhöhte ACTH-Werte im Blut. Hierbei ist aber die Pars intermedia die Quelle der Sekretion, anders als bei gesunden Tieren, wo das ACTH aus der Pars distalis stammt (MCFARLANE et al. 2006).

Die physiologische Wirkung von ACTH ist die Ausschüttung von Kortisol aus der Nebennierenrinde. Trotzdem liegen die Serum-Kortisolspiegel bei den meisten erkrankten Pferden, anders als bei Menschen und Hunden mit Cushing-Syndrom, oft im Referenzbereich oder sind sogar erniedrigt (BOUJON et al. 1993, BEECH et al. 2011a, HART et al. 2016). Auch eine Hyperplasie der Nebennierenrinde wurde selten in pathologischen Studien gefunden (HEINRICHS et al. 1990, BOUJON et al. 1993, OKADA et al. 1997, MILLER et al. 2008). Der zirkadiane Rhythmus der Kortisolausschüttung ist jedoch gestört (MOORE et al. 1979, ORTH et al. 1982a, DYBDAL et al. 1994). Aufgrund der oft normalen bis erniedrigten Serum-Kortisolwerte bei gleichzeitig erhöhten ACTH-Konzentrationen vermutet man, dass das ACTH aus Adenomen der Pars intermedia weniger biologisch aktiv ist (MOORE et al. 1979, ORTH and NICHOLSON 1982b). SOMMER (2003) konnte mittels eines Bioassays zeigen, dass das Verhältnis von biologisch aktivem zu immunreaktivem ACTH im Plasma von Pferden mit PPID geringer ist als bei gesunden Tieren. HART et al. (2016) deuteten darauf hin, dass bei der Beurteilung des Kortisolwertes das Verhältnis von freiem und an Proteine gebundenen Kortisol von Bedeutung ist. Das freie Kortisol ist biologisch aktiv. In ihrer Studie beschrieben sie bei Pferden mit PPID zwar keinen Anstieg des Gesamtkortisolspiegles im Vergleich zu gesunden, gleichaltrigen Kontrolltieren, aber eine Erhöhung der Free Cortisol Fraction (FCF), dem Anteil des freien, ungebundenen Kortisols an der Gesamtkonzentration im Blut.

#### **2.3.4. Klinische Symptome**

Die klinischen Symptome der PPID werden auf die vermehrte Ausschüttung der POMC-Spaltprodukte zurückgeführt (MCFARLANE et al. 2005b). Viele Symptome werden auch dem Kortisol zugeschrieben, obwohl eine Hyperkortisolämie bei Pferden mit PPID eher selten zu finden ist (FRANK et al. 2006a, MCFARLANE et al. 2015). In fortgeschrittenen Fällen kann auch eine Kompression angrenzender Hirnareale durch die größer werdenden Adenome klinische Ausfälle verursachen (SCHOTT 2002).

##### Hypertrichose

Die Hypertrichose, ein übermäßiges Fellwachstum, stellt das am häufigsten beschriebene

Symptom der PPID dar (VAN DER KOLK et al. 1993, IRELAND and MCGOWAN 2018). Es kommt zu starkem, zum Teil auch lockigem Fellwachstum. Dabei kann dieses Symptom als pathognomonisch angesehen werden (VAN DER KOLK et al. 1995, FRANK et al. 2006a). In manchen Fällen weisen die Pferde jedoch nur einen verspäteten oder inkompletten Fellwechsel oder das Verbleiben von einzelnen langen Haaren in einem ansonsten normalen Fell auf (SCHOTT 2002).

### Hyperhidrosis

Vermehrtes Schwitzen (Hyperhidrosis) tritt häufig im Zusammenhang mit der Hypertrichose auf (GEHLEN and BRADARIC 2013a). Obwohl manche Pferde mit PPID sicherlich aufgrund des starken Fellwachstums schwitzen, gibt es andere Tiere, die auch in kalter Umgebung oder mit geschorenem Fell exzessives Schwitzen zeigen (MCFARLANE 2011).

### Abnormale Fettumverteilung

Die Tiere weisen typischerweise Fettansammlungen hinter den Augen in der Fossa supraorbitalis, am Mähnenkamm, im Bereich des Präputiums oder Euters oder an der Kruppe auf (SCHOTT 2006, FRANK et al. 2006b). Durch hohe Kortisolspiegel kann es zu einem veränderten Fettstoffwechsel und einer abnormalen Fettverteilung kommen, da Glukokortikoide die Proliferation und Differenzierung von Adipozyten stimulieren (HART et al. 2016). Auch eine mit der PPID vergesellschaftete eventuelle Hyperinsulinämie kann durch die Hemmung der Lipolyse zu den abnormen Fettansammlungen beitragen (SCHOTT 2002).

### Insulin Resistenz

Die Insulin Resistenz (IR) ist ein häufiger Befund bei Pferden mit PPID (JOHNSON et al. 2004a, MCFARLANE 2011). Die IR beschreibt ein Krankheitsbild, bei der eine normale Insulinkonzentration im Körper nicht die angemessene physiologische Reaktion an den Zellen auslöst. Glukose wird nicht adäquat in die Zellen aufgenommen, im Blut kommt es zu einer persistierenden normal bis zu hohen Glukosekonzentration. Dies ist ein ständiger Stimulus für die Insulinausschüttung aus dem Pankreas. Die Folge ist eine Hyperinsulinämie (MCGOWAN et al. 2004, GRENAGER 2010, HART et al. 2016). MCGOWAN et al. (2013b) beschrieben Insulinwerte über dem Referenzbereich bei 32 % von 69 an PPID erkrankten Pferden. Während die IR direkt durch Kortisol und seine antagonistischen Effekte auf Insulin ausgelöst werden könnte, ist es außerdem möglich, dass Pferde schon eine IR aufweisen, bevor sie an PPID erkranken (CARO and AMATRUDA 1982, JOHNSON et al. 2004a). Es könnte sich um zwei unabhängige Endokrinopathien handeln, die zuweilen gleichzeitig vorkommen (MASTRO et al. 2015, TADROS et al. 2018).

### Hufrehe

Dies ist die wohl wichtigste klinische Komplikation im Zusammenhang mit PPID, da sie nicht selten zur Euthanasie führt (VINUELA-FERNANDEZ et al. 2011). Die Hufrehe ist eine schmerzhafte Erkrankung, bei der es zu einer Dysfunktion und Entzündung des Hufbeinträgers kommt (COLLINS et al. 2010). MCGOWAN et al. (2013b) zeigten, dass die Wahrscheinlichkeit an Hufrehe zu erkranken, bei Pferden  $\geq 15$  Jahren mit PPID höher ist als bei gesunden älteren Tieren. Die Prävalenz für die Entwicklung von Hufrehe bei Pferden mit PPID wird dabei mit 24 – 82 % angegeben (SCHOTT 2002). In einer Untersuchung von DONALDSON et al. (2004) litten von 40 untersuchten Pferden mit Hufrehe 70 % an einer Dysfunktion der Hypophyse. Verschiedene Pathomechanismen werden bei der Entwicklung von Hufrehe bei Pferden mit PPID diskutiert, der genaue Zusammenhang ist aber noch unklar (SECOMBE et al. 2018). Kortisol verstärkt die durch Katecholamine ausgelöste Vasokonstriktion und könnte damit zu einer Minderdurchblutung und einer Schädigung der Huflederhaut führen (JOHNSON et al. 2004b). Auch die Rolle des Insulins tritt immer mehr in den Mittelpunkt, da Pferde mit PPID nicht selten erhöhte Konzentrationen im Blut aufweisen (MCGOWAN et al. 2013b). In einer Studie von 2010 verursachten DE LAAT et al. bei vier klinisch gesunden Pferden eine persistierende Hyperinsulinämie und lösten bei allen Tieren nach 48 Stunden Hufrehe aus (DE LAAT et al. 2010). Durch Insulin verursachte verschiedene hämodynamische Veränderungen könnten an der Pathogenese beteiligt sein (JOHNSON et al. 2004a).

### Polyurie/Polydipsie

Dieses Symptom tritt bei ungefähr 30 % der an PPID erkrankten Pferde auf (MCFARLANE 2011). Diskutierte Ursachen sind eine Kompression der Neurohypophyse und somit ein Fehlen des Antidiuretischen Hormons (ADH), eine zentrale Durststeigerung durch die Hyperkortisolämie und eine osmotische Diurese aufgrund einer Hyperglykämie und somit Glukosurie (SCHOTT 2002, MCFARLANE 2011).

### Muskelatrophie

Durch die Atrophie der epaxialen Muskulatur kommt es bei vielen Tieren zu dem typischen Bild des Senkrückens und Pendelabdomens (DURHAM et al. 2014, IRELAND and MCGOWAN 2018). Hormonimbalancen wie ein erhöhter Kortisolspiegel oder eine Insulin Resistenz sowie chronische Entzündungen könnten die Ursache sein (TICE and ENGEL 1967, MCFARLANE 2011).

### Lethargie

Oft werden bei Pferden mit PPID Verhaltensänderungen wie Trägheit und Lethargie beschrieben (ORTH et al. 1982a). Nach MILLINGTON et al. (1988) könnte eine vermehrte

Ausschüttung von  $\beta$ -Endorphin der Grund für diese Verhaltensänderung sein.

#### Erhöhte Anfälligkeit für Infektionen

Opportunistische und Sekundärinfektionen wie das wiederholte Auftreten von Pneumonien oder Abszessen sind ebenfalls Teil des klinischen Bildes (MCFARLANE 2011). Hohe Serum-Kortisolkonzentrationen können zu einer Immunsuppression führen (AUPHAN et al. 1995). Da bei Pferden mit PPID die Kortisolwerte jedoch häufig normal oder sogar erniedrigt sind, steht auch das  $\alpha$ -MSH im Verdacht, für die Infektionsanfälligkeit verantwortlich zu sein, da es bei Menschen und Ratten immunmodulatorische Eigenschaften besitzt (MCFARLANE et al. 2015). Dies konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden.

#### Fruchtbarkeitsstörungen

Eine herabgesetzte dopaminerge Steuerung der gonadotropen Hormone oder chronische Infektionen des Uterus können Ursachen sein, wieso manche Stuten mit PPID nicht mehr aufnehmen oder einen gestörten Ovulationszyklus zeigen (MCFARLANE 2011). Da PPID aber auch eine altersassoziierte Erkrankung ist, sollte man das Alter als Ursache von Fruchtbarkeitsstörungen nicht außer Acht lassen (BURNS 2016).

#### Neurologische Symptome

Neurologische Symptome wie Blindheit oder Ataxie werden mit einer Kompression angrenzender Hirnareale wie dem Chiasma opticum durch die größer werdende Neoplasie erklärt. Trotzdem sind dies nur Hypothesen (SCHOTT 2002).

### **2.3.5. Diagnose**

#### **2.3.5.1. Klinische Untersuchung**

Die Verdachtsdiagnose wird meistens anhand des klinischen Bildes gestellt (SECOMBE et al. 2018). Mit der Hypertrichose als pathognomonischem Symptom kann die Erkrankung so häufig ohne weitere Untersuchungen diagnostiziert werden (SCHOTT 2006). FRANK et al. (2006a) beschrieben in ihrer Studie, dass die Hypertrichose mit einer Sensitivität von 71 % und einer Spezifität von 95 % eine höhere diagnostische Aussagekraft besitzt als viele andere diagnostische Tests.

### **2.3.5.2. Blutbild und Blutchemie**

Blutbild und Blutchemie sind in der Regel ohne besonderen Befund. Die häufigste Veränderung ist eine Hyperglykämie. Gelegentlich können auch eine milde Anämie sowie eine absolute oder relative Neutrophilie oder Lymphopenie auftreten (SCHOTT 2002). In manchen Fällen findet man erhöhte Leberenzyme, wobei eine Glukokortikoid-induzierte Hepatopathie als Ursache diskutiert wird (MCFARLANE 2011).

### **2.3.5.3. Hormonbestimmung und endokrinologische Funktionstests**

Da die klinische Symptomatik nicht immer eindeutig ist, werden oft Hormonbestimmungen und endokrinologische Funktionstest zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose hinzugezogen (SECOMBE et al. 2018). SCHOTT et al. (2017) bezeichneten in den von ihrer Arbeitsgruppe erstellten „Empfehlungen zur Diagnose und Behandlung der PPID“ die Bestimmung des ACTH-Basalwertes sowie den TRH-Stimulationstest als diagnostische Tests der Wahl. Der früher als Goldstandard angesehene Dexamethason-Suppressionstest kann den Autoren nach zur Unterstützung mit herangezogen werden. Auch eine speziell auf die Vergrößerung der Pars intermedia ausgerichtete MRT Untersuchung kann die Diagnose weiter bestätigen. Die Messung des Kortisol-Basalwertes, der TRH-Stimulationstest mit der Messung von Kortisol, der orale Domperidon-Belastungstest oder der kombinierte Dexamethason-Suppressions- /TRH-Stimulationstest gelten als veraltet und werden nach den oben genannten Empfehlungen nicht mehr als geeignet für die Diagnose angesehen.

Allgemein ist zu beachten, dass falsch-negative Ergebnisse aufgrund des langsam progressiven Fortschreitens der PPID häufig in frühen Stadien der Erkrankung vorkommen. Signifikante pathologische Veränderungen können schon vorhanden sein, obwohl diagnostische Tests noch nicht eindeutig auf eine PPID hinweisen (FRANK et al. 2006a, MCFARLANE 2011).

### **2.3.5.4. Messung des ACTH-Wertes**

Die Messung des ACTH-Wertes im Blut stellt aufgrund der einfachen Probenentnahme wohl den am häufigsten angewandten diagnostischen Test bei Verdacht auf PPID dar (SECOMBE et al. 2018). In einer einzigen Blutprobe wird dabei der ACTH-Wert bestimmt. Bei Pferden mit PPID kommt es zu einer Überproduktion von immunreaktivem ACTH aus der Pars intermedia, wodurch es zu einer Erhöhung des Plasma-ACTH-Wertes kommt (MCFARLANE et al. 2006,

LEE et al. 2010, DURHAM et al. 2014). Dabei haben erkrankte Pferde signifikant höhere ACTH-Werte als gesunde Tiere, wodurch die Messung dieses Hormons eine geeignete Methode für die Diagnose von PPID darstellt (LEE et al. 2010, COPAS and DURHAM 2012, SCHOTT et al. 2017). Trotzdem zeigen nicht alle erkrankten Pferde erhöhte ACTH-Werte. In frühen Stadien kann der Test eine geringe Sensitivität aufweisen (BEECH et al. 2007, MILLER et al. 2008).

In verschiedenen Studien wurden unterschiedliche Referenzbereiche für ACTH beschrieben. COUËTIL et al. (1996) zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen gesunden Pferden und Ponys bezüglich ihrer durchschnittlichen ACTH-Werte auf (Pferde:  $18,68 \pm 6,79$  pg/ml, Ponys:  $8,35 \pm 2,29$  pg/ml). ACTH-Werte  $> 50$  pg/ml bei Pferden und  $> 27$  pg/ml bei Ponys wiesen den Autoren nach stark auf eine PPID hin. Die Stichprobenanzahl für die Berechnung der Referenzwerte war jedoch sehr gering (18 Pferde, neun Ponys). DONALDSON et al. (2005) und MCGOWAN et al. (2013a) konnten keinen Unterschied zwischen Pferden und Ponys bezüglich der Referenzbereiche nachweisen. MCGOWAN et al. (2013a) untersuchten die ACTH-Basalwerte von 325 Pferden und Ponys  $\geq 15$  Jahren und ermittelten einen Cut-off-Wert für die PPID-Diagnose von 29,7 pg/ml. Dabei wurden alle Pferde, die ACTH-Werte unterhalb dieses Cut-off-Wertes aufwiesen, als gesund angesehen und alle, deren ACTH-Werte darüber lagen, als krank. Die Sensitivität lag bei 80 %, die Spezifität bei 83 %. Als ante mortem „Goldstandard“ für die Diagnose von PPID verwendeten sie das klinische Bild der Hypertrichose plus drei oder mehr klinische Anzeichen für PPID. Die Autoren merkten jedoch an, dass dadurch eher Pferde mit fortgeschrittener Erkrankung ausgewählt wurden und ihr ermittelter Cut-off-Wert frühe PPID-Erkrankungen eventuell nicht mitberücksichtigt. Als Referenzwerte werden von der Equine Endocrinology Group (SCHOTT et al. 2017) in ihren „Empfehlungen zur Diagnose und Behandlung der PPID“ 30 - 50 pg/ml angegeben. Ein Ergebnis  $< 30$  pg/ml gilt als negativ, werden 50 pg/ml überschritten, deutet dies stark auf eine PPID hin. Bei nicht eindeutigen Messergebnissen zwischen 30 und 50 pg/ml wird der TRH-Stimulationstest zur präziseren Diagnostik empfohlen. Die Autoren weisen gleichzeitig darauf hin, dass die empfohlenen Referenzwerte je nach Labor und Messmethode variieren können.

Die von DONALDSON et al. (2005) entdeckte saisonale Erhöhung der ACTH-Werte im Herbst, bleibt auch bei Pferden mit PPID erhalten (BEECH et al. 2009). COPAS und DURHAM (2012) zeigten, dass dieser Anstieg bei erkrankten Pferden sogar höher ist als bei gesunden Tieren. Dies brachte die Autoren zu der Schlussfolgerung, dass bei Verwendung angepasster Referenzwerte für ACTH, gerade die Herbstmonate zur Diagnose von PPID geeignet sein könnten. Sie berechneten einen Cut-off-Wert von 47 pg/ml für die Monate August, September und Oktober. Auch MCGOWAN et al. (2013a) gaben an, dass eine höhere Sensitivität und

Spezifität bei der Messung des ACTH-Basalwertes für die PPID-Diagnostik im Herbst erreicht werden können, wenn angepasste Referenzbereiche verwendet werden. Sie ermittelten eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 95 % im Herbst bei einem Cut-off-Wert von 77,4 pg/ml. SCHOTT et al. (2017) empfehlen für den Zeitraum von Mitte Juli bis Mitte November einen Referenzbereich von 50 - 100 pg/ml, wobei Pferde mit Werten < 50 pg/ml als gesund angesehen werden und Pferde mit Werten > 100 pg/ml als erkrankt. Messergebnisse zwischen 50 und 100 pg/ml werden von den Autoren als nicht eindeutig bewertet. Da es zurzeit jedoch keine geeigneten Referenzwerte für den TRH-Stimulationstest im Herbst gibt, kann dieser Test in diesen Monaten nicht empfohlen werden, wie in Abschnitt 2.3.5.5. der vorliegenden Arbeit näher erläutert.

Da keine bedeutenden tageszeitlichen Schwankungen der ACTH-Sekretion festgestellt werden konnten (LEE et al. 2010, RENDLE et al. 2014), kann die Messung nach SCHOTT et al. (2017) zu jeder Tageszeit erfolgen.

Die Handhabung der Blutproben hat dagegen einen Einfluss auf die ACTH-Konzentration. Um die in vitro Stabilität von ACTH beizubehalten, müssen die Blutproben gekühlt werden (DURHAM et al. 2014). BRÜNS (2001) zeigte, dass die Abbaurate von ACTH in Plasmaproben nach 24 Stunden Lagerung bei -22°C deutlich geringer war als bei 20°C. Kälte wirkt stabilisierend, da der enzymatische Abbau des ACTH verlangsamt wird (BRÜNS 2001). RENDLE et al. (2015) beschrieben eine signifikante Reduktion der ACTH-Konzentrationen in Plasmaproben von Pferden mit PPID, die bei Raumtemperatur (22°C) gelagert wurden. Diese Reduktion war jedoch erst nach 4 Stunden signifikant. Eine weitere Möglichkeit, um den enzymatischen Abbau des ACTH zu verlangsamen, ist der Zusatz des Proteasehemmers Aprotinin (DURHAM et al. 2014). BRÜNS (2001) beschrieben einen höheren ACTH-Gehalt in Plasmaproben mit Aprotininzusatz verglichen mit zusatzfreien Proben. Nach GEHLEN und BRADIAC (2013) hat der Zusatz von Aprotinin keinen Einfluss auf die gemessenen ACTH-Konzentrationen. Eine sofortige Zentrifugation erbrachte jedoch signifikant höhere ACTH-Werte als in Proben, die erst nach einer Stunde zentrifugiert wurden. SCHOTT et al. (2017) empfehlen die Entnahme mit einem EDTA-Röhrchen und eine sofortige und dauerhafte Kühlung der Proben. Ein Zusatz von Aprotinin ist den Autoren nach nicht nötig. Bevor die Proben eingefroren oder versendet werden, sollten sie zentrifugiert werden. Die Proben können, müssen aber nicht eingefroren werden. Eine Zentrifugation ist jedoch vor dem Einfrieren notwendig, da nicht zentrifugierte, eingefrorene Proben aufgrund von Zellresten, die eventuell immunreaktive Peptide tragen, zu höheren Messergebnissen führen können (DURHAM et al. 2014). In bei -20°C eingefrorenem Plasma ist das ACTH für 30 Tage stabil (PRUTTON et al. 2015).

Wie in der vorliegenden Arbeit zuvor erwähnt, können auch Schmerz, Stress, körperliche Belastung oder Krankheit die ACTH-Werte im Blut beeinflussen (ALEXANDER et al. 1991, FAZIO et al. 2008, AYALA et al. 2012). Nach TENNANT (2013b) und SECOMBE et al. (2018) können aber nur starker Stress und/oder Schmerz die ACTH-Werte signifikant erhöhen. Ob auch gering- oder mittelgradige Schmerzen zu einer Erhöhung der ACTH-Werte führen, so dass die Spezifität der ACTH-Messung zur PPID-Diagnostik negativ beeinflusst wird, ist Gegenstand der vorliegenden Studie.

#### **2.3.5.5. TRH-Stimulationstest**

In mehreren Untersuchungen wurde beobachtet, dass die Plasma-ACTH-Werte bei erkrankten Pferden im Referenzbereich lagen, obwohl sie post mortem eine Hyperplasie oder ein Adenom der Pars intermedia aufwiesen (BEECH et al. 2007, MILLER et al. 2008). Um solche Pferde trotzdem frühzeitig zu diagnostizieren, kann ein Funktionstest, der die Ausschüttung von ACTH aus den Zellen der Pars intermedia provoziert, hilfreich sein (BEECH et al. 2011b).

Das Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH), auch Thyreoliberin oder Protirelin genannt, ist ein Peptidhormon, welches physiologisch im Hypothalamus gebildet wird und an den thyreotropen Zellen der Pars distalis die Ausschüttung vom Thyreoidea-stimulierenden Hormon (TSH) initiiert (RASSOW et al. 2008). TRH wirkt zusätzlich an den melanotropen Zellen der Pars intermedia sowie an den kortikotropen Zellen der Pars distalis über den TRH R1 Rezeptor und bewirkt dort eine Ausschüttung von POMC-Spaltprodukten (MCFARLANE et al. 2006). MCFARLANE et al. (2006) konnten die TRH R1 Rezeptor mRNA in der equinen Pars intermedia und Pars distalis nachweisen. In derselben Studie untersuchten die Autoren an sieben Pferden mit PPID und 16 gesunden Kontrolltieren die Auswirkungen von TRH auf die Hypophyse. Sie fanden heraus, dass nach intravenöser TRH-Applikation die Plasma-ACTH-Werte bei gesunden Tieren und auch bei Pferden mit PPID anstiegen. Der Anstieg war dabei bei den PPID-Pferden signifikant höher. Zu demselben Ergebnis kamen auch BEECH et al. (2007). Nach TRH-Applikation stiegen in ihrer Untersuchung die ACTH-Werte bei gesunden sowie bei PPID-Pferden an. Auch hier war der Anstieg bei erkrankten Tieren signifikant größer. Der TRH-Stimulationstest scheint zudem sensitiver als die Einzelmessung von ACTH zu sein und kann als ein geeigneter Test zur Identifizierung erkrankter Pferde im Frühstadium dienen (BEECH et al. 2007, FUNK et al. 2011, BEECH et al. 2011b).

Beim TRH-Stimulationstest wird zunächst der ACTH-Basalwert im Plasma gemessen. Im Anschluss werden 1 mg TRH intravenös injiziert. Nach TRH-Stimulation zeigen die ACTH-

Plasmakonzentrationen einen Höchstwert nach 2 - 10 Minuten und sinken dann innerhalb von einer Stunde wieder auf den Basalwert zurück (BEECH et al. 2007, FUNK et al. 2011). Nach 10 und/oder 30 Minuten wird erneut der ACTH-Wert im Plasma bestimmt. BEECH et al. (2007) verwendeten 35 pg/ml als oberen Grenzwert für das ACTH 30 Minuten nach TRH-Stimulation und beschrieben eine Spezifität von 89 % und eine Sensitivität von 100 % bei dieser Testdurchführung. Als Referenzbereich für den ACTH-Wert nach 10 Minuten werden von der Equine Endocrinology Group 110 - 200 pg/ml angegeben (SCHOTT et al. 2017).

FUNK et al. (2011) fanden heraus, dass auch der TRH-Stimulationstest von der Jahreszeit beeinflusst wird. Sie bestimmten höhere Konzentrationen von ACTH nach TRH-Stimulation im Herbst. Auch DIEZ DE CASTRO et al. (2014) konnten höhere stimulierte ACTH-Werte in den Monaten Juli und September nachweisen als in den Monaten März und April. Für den TRH-Stimulationstest gibt es derzeit noch keine validierten Referenzwerte für die Zeit zwischen Mitte Juli bis Mitte November. Daher sollte der Test nicht im Herbst durchgeführt werden (SCHOTT et al. 2017).

Über die Auswirkungen von Schmerz auf den TRH-Stimulationstest gibt es derzeit keine Untersuchungen.

#### **2.3.5.6. Dexamethason-Suppressionstest**

Der Dexamethason-Suppressionstest (DST) basiert auf dem negativen Feedbackmechanismus von Kortisol auf die Hypophysen-Nebennieren-Achse. Bei diesem Test wird zunächst zwischen 16:00 und 18:00 Uhr der Kortisol-Basalwert aus dem Serum bestimmt. Danach erfolgt eine intramuskuläre Injektion von 0,04 mg/kg Dexamethason. Nach 19 - 20 Stunden wird der Kortisolwert im Serum erneut gemessen (MCFARLANE 2011). Bei gesunden Pferden hemmt das injizierte Dexamethason über Glukokortikoidrezeptoren an den kortikotropen Zellen die ACTH-Ausschüttung aus der Pars distalis. Dadurch kommt es zu einer verminderten Kortisolausschüttung aus der Nebennierenrinde. Die Pars intermedia besitzt jedoch keine Glukokortikoidrezeptoren (ANTAKLY and EISEN 1984). Der Theorie nach können an PPID erkrankte Pferde die Kortisolausschüttung aus der Nebennierenrinde nicht unterdrücken, weil durch die Pars intermedia weiterhin ACTH ausgeschüttet wird. Ein Kortisolwert von > 1µg/dL, 19 Stunden nach Dexamethason-Injektion, weist daher auf eine PPID hin (DYBDAL et al. 1994, MCFARLANE 2011). DYBDAL et al. (1994) gaben für den DST eine Sensitivität und Spezifität von 100 % an und er galt lange Zeit als Goldstandard in der PPID-Diagnostik (SCHOTT 2002). Darauf folgende Untersuchungen zeigten hingegen eine

geringe Sensitivität für diesen Test (FRANK et al. 2006a, BEECH et al. 2007). Grade in frühen Erkrankungsstadien oder bei subklinischer PPID kann es zu falsch-negativen Ergebnissen kommen (DURHAM et al. 2014). Auch der Dexamethason-Suppressionstest wird von der Jahreszeit beeinflusst und könnte im Herbst zu falsch-positiven Ergebnissen führen (DONALDSON et al. 2005, JACOB et al. 2017). Weitere Nachteile sind, dass die Durchführung an zwei aufeinander folgenden Tagen erfolgen muss und dass das Dexamethason im Verdacht steht, Hufrehe auslösen zu können. Ein direkter Zusammenhang konnte bisher jedoch nicht bestätigt werden (DURHAM et al. 2014, JORDAN et al. 2017).

### **2.3.5.7. Bildgebende Verfahren**

Die Messung der vergrößerten Pars intermedia mittels Magnetresonanztomographie (MRT) kann nach SCHOTT et al. (2017) als unterstützende Maßnahme bei der Diagnostik herangezogen werden. Da diese Untersuchung jedoch sehr teuer ist und nur in Vollnarkose durchgeführt werden kann, ist sie, außer für wissenschaftliche Zwecke, nicht praktikabel (MCFARLANE 2011).

### **2.3.6. Therapie**

#### **2.3.6.1. Pergolid**

Pergolid ist ein Dopaminrezeptor-Agonist und heutzutage das Mittel der Wahl zur Behandlung der PPID (SCHOTT et al. 2017). In Deutschland ist es als Prascend® von der Firma Boehringer Ingelheim für das Pferd zugelassen. Pergolid wirkt am Dopamin D1- und D2-Rezeptor mit einer stärkeren Affinität zu den inhibierenden D2-Rezeptoren. Diese werden in den melanotropen Zellen der Pars intermedia exprimiert (MCFARLANE et al. 2017). Durch die Aktivierung dieser Rezeptoren wird die Produktion und Ausschüttung der POMC-Spaltprodukte wie dem ACTH vermindert (ORTH et al. 1982a, MCFARLANE 2006). Die Dosierung muss individuell angepasst werden. Zu Anfang wird die orale Applikation von 2 µg/kg Körpergewicht alle 24 Stunden empfohlen. Dies entspricht einer Dosierung von 1 mg/kg/Tag für ein 500 kg schweres Pferd. Nach 30 Tagen sollte der für die Diagnose der PPID verwendete Labortest erneut evaluiert werden, um den Therapieerfolg zu kontrollieren. Veränderungen der klinischen Symptome können erst nach zwei Monaten sicher beurteilt werden (SCHOTT et al. 2017). Bei fehlender Verbesserung der Laborwerte und/oder der klinischen Symptome kann die Dosierung schrittweise auf bis zu 4 - 6 µg/kg pro Tag gesteigert werden, bis zu einer

Maximaldosis von 10 µg/kg alle 24 Stunden (SCHOTT et al. 2017, SECOMBE et al. 2018). Die Behandlung sollte ein Leben lang erfolgen (MCFARLANE 2011). Zu den möglichen Nebenwirkungen gehören Appetitlosigkeit, manchmal auch Apathie oder Durchfall (PONGRATZ et al. 2010) .

### **2.3.6.2. Cyproheptadin**

Eine zusätzliche Gabe des Serotonin-Antagonisten Cyproheptadin wird beschrieben, wenn die Monotherapie mit Pergolid nicht die gewünschten Erfolge bringt (SCHOTT et al. 2017). Ein Absinken des ACTH-Wertes sowie eine Verbesserung der klinischen Symptome von PPID-Pferden wurden bei der Verwendung von Cyproheptadin beschrieben. Im Vergleich zu Pergolid ist die Wirksamkeit jedoch geringer (SCHOTT et al. 2001, DONALDSON et al. 2002, PERKINS et al. 2002). Cyproheptadin kann sedierende Effekte haben, weshalb mit der niedrigsten Dosis von 0,25 mg/kg zweimal täglich oder 0,5 mg/kg einmal täglich begonnen werden sollte (SECOMBE et al. 2018).

### **2.3.6.3. Mönchspfeffer (Vitex agnus castus)**

Mönchspfeffer (Vitex agnus castus) wird ebenfalls für die Therapie der PPID eingesetzt. Die Früchte dieses Strauchs enthalten aktive Substanzen, die bei Ratten durch die Bindung am Dopamin D2-Rezeptor die Ausschüttung von Prolaktin inhibieren (JARRY et al. 1994, BRADARIC 2012). Untersuchungen zur Wirksamkeit dieses Präparates bei Pferden mit PPID sind jedoch widersprüchlich (BEECH et al. 2002, BRADARIC 2012).

## **2.4. Herzfrequenzvariabilität**

### **2.4.1. Definition**

Die Herzfrequenzvariabilität (HFV) ist ein Marker für die Aktivität des autonomen Nervensystems. Sie beschreibt die Schwankungen der Abstände zwischen aufeinander folgenden Herzschlägen (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY 1996). Eine gesunde Herzfunktion ist charakterisiert durch ungleiche Zeitintervalle zwischen den Herzaktionen (VON BORELL et al. 2007). Die Herzfrequenz wird vor allem durch das autonome Nervensystem gesteuert. Der Sympathikus und der Parasympathikus haben Einfluss auf den Sinusknoten und bewirken in ihrem Zusammenspiel zeitliche Schwankungen zwischen den Herzschlägen, die Herzfrequenzvariabilität. Sie ermöglicht es dem Organismus, sich auf wechselnde Einflüsse auf das kardiovaskuläre System einzustellen (AKSELROD et al. 1981). Neben dem autonomen Nervensystem haben auch andere Faktoren wie das Renin-Angiotensin-System oder die Thermoregulation Einfluss auf die HFV (LOMBARDI et al. 1996).

### **2.4.2. Analyse der Herzfrequenzvariabilität**

Klinische Relevanz erlangte die Messung der Herzfrequenzvariabilität in der Humanmedizin bei der Überwachung der autonomen Neuropathie bei Diabetes mellitus oder der Einschätzung des Mortalitätsrisikos nach einem Myokardinfarkt (KAUTZNER and CAMM 1997, CHUN et al. 2011, BOSKOVIC et al. 2014). Auch in der Veterinärmedizin findet sie vermehrt Anwendung in Untersuchungen zu beispielsweise Stress, Schmerz oder den Auswirkungen bestimmter Trainings- bzw. Managementmethoden auf das Tier (RIETMANN et al. 2004a, VON BORELL et al. 2007, SCHMIDT et al. 2010).

Die Analyse erfolgt anhand eines aufgezeichneten Elektrokardiogrammes (EKG). Dabei werden die Abstände zwischen aufeinanderfolgenden R-Zacken eines QRS-Komplexes bestimmt, die RR-Intervalle. Es werden aber nur diejenigen R-Zacken berücksichtigt, denen eine p-Welle vorausging, die also durch eine Sinusknoten-Depolarisation entstanden sind. Diese Abstände zwischen den R-Zacken „normaler“ Herzschläge werden Normal-zu-Normal (NN) Intervalle genannt (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY 1996). Die HFV kann mittels zeitbezogener und frequenzbezogener Methoden analysiert werden.

#### **2.4.2.1. Zeitbezogene Parameter der Herzfrequenzvariabilität**

Die Berechnung der zeitbezogenen Parameter ist die einfachste Form der HFV-Analyse. Die NN-Intervalle werden mit Methoden der deskriptiven Statistik ausgewertet (MALIK and CAMM 1990, BERNTSON et al. 1997). So kann beispielsweise der Durchschnitt der NN-Intervalle, die Standardabweichung der NN-Intervalle (standard deviation of NN, SDNN) oder die Quadratwurzel des Mittelwerts aller Quadrate der Differenzen aufeinander folgender NN-Intervalle (root mean square of successive differences, RMSSD) berechnet werden (TARVAINEN et al. 2014).

Mit der SDNN wird die Gesamtvariabilität der NN-Intervalle im Messzeitraum dargestellt. Dabei sollten die EKG-Sequenzen stets die gleiche Länge haben, da die Varianz der HFV-Daten mit der Länge der analysierten Sequenz zunimmt. Durch die Messung der RMSSD können die hochfrequenten Schwankungen zwischen den Herzschlägen geschätzt werden, die den Parasympathikus repräsentieren (VON BORELL et al. 2007).

#### **2.4.2.2. Frequenzbezogene Parameter der Herzfrequenzvariabilität**

Bei der frequenzbezogenen Analyse der HFV erfolgt eine Evaluierung der Periodizitäten innerhalb der Daten, also der Zeitreihe der RR- bzw. NN-Intervalle (MALIK and CAMM 1990). Mittels Spektralanalyse wird ermittelt, aus welchen Frequenzanteilen sich die HFV zusammensetzt (LOMBARDI et al. 1996). Ein dafür häufig verwendetes Verfahren ist die Fast Fourier Transformation (FFT) (KUWAHARA et al. 1996). Die FFT ist ein Algorithmus, mit dem ein Signal in seine Frequenzanteile zerlegt werden kann. Dabei wird die Zeitreihe als Summe von Sinusschwingungen mit unterschiedlichen Sequenzen dargestellt (OEL et al. 2006, VON BORELL et al. 2007). Eine Voraussetzung für dieses Verfahren ist jedoch, dass die Zeitabstände der Messdaten immer gleich sein müssen, was sie bei einer Herzaktion nicht sind. Die EKG-Daten sollten daher erst bearbeitet und durch Interpolation eine Zeitreihe mit abstandsgleichen Messpunkten erstellt werden. Zusätzlich können die Daten durch Arrhythmien oder Artefakte gestört sein, die manuell oder mithilfe von Filtern entfernt werden müssen (VON BORELL et al. 2007). Das Messspektrum der HFV umfasst verschiedene Frequenzbereiche (BERNTSON et al. 1997):

- Ultra Low Frequency (ULF)
- Very Low Frequency (VLF)
- Low Frequency (LF)
- High Frequency (HF)

Während für die Humanmedizin die Frequenzbereiche von der TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY (1996) festgelegt wurden, gibt es für das Pferd noch keine einheitlich geltenden Angaben. So wurden von GEHRKE et al. (2011) die für die Humanmedizin geltenden Frequenzbereiche verwendet:

- LF: 0,04 Hz - 0,15 Hz
- HF: 0,15 Hz - 1,4 Hz

KUWAHARA et al. (1996) hingegen definierten andere Referenzwerte für das Pferd:

- LF: 0,01 Hz - 0,07 Hz
- HF: 0,07 Hz - 0,6 Hz

Von RIETMANN et al. (2004b) wurden die Frequenzbereiche für das Pferd weiter angepasst:

- LF: 0,05 Hz - 0,15 Hz
- HF: 0,15 Hz - 0,5 Hz

Die Regulation der Herzfrequenz durch den Parasympathikus erfolgt schneller, als die durch den Sympathikus. Nur die parasympathische Signalkette am Herzen reagiert schnell genug, um hochfrequente Schwankungen der Herzfrequenz zu verursachen (AKSELROD et al. 1981). Die hochfrequenten Anteile (HF) der HFV können daher vor allem dem Parasympathikus zugeschrieben werden, während die tieffrequenten Anteile (LF) den sympathischen Tonus und auch die Parasympathikusaktivität widerspiegeln (AKSELROD et al. 1981, KUWAHARA et al. 1996, OHMURA et al. 2001).

Der hochfrequente Bereich (HF) der HFV hängt von der Atemfrequenz ab und sollte diese umfassen (KUWAHARA et al. 1996). Die Korrelation von Herz- und Atemfrequenz äußert sich in der respiratorischen Sinusarrhythmie. Sie wird vom Parasympathikus vermittelt und führt zu einer Verkürzung der RR-Intervalle bei der Einatmung und einer Verlängerung dieser bei der Ausatmung (YASUMA and HAYANO 2004). Bei einem Pferd in Ruhe mit 8 – 16 Atemzügen pro Minute entspräche dies einem Frequenzbereich von 0,13 Hz – 0,26 Hz (VON BORELL et al. 2007). Für Studien zur HFV unter Belastung müssen die HF-Frequenzbereiche der erhöhten Atemfrequenz angepasst werden (COTTIN et al. 2006, TARVAINEN et al. 2014). Da der Sympathikus und der Parasympathikus die LF-Komponente beeinflussen, wird angenommen, dass sich mit dem LF/HF-Verhältnis die sympathovagale Balance messen lässt (LOMBARDI et al. 1996, OHMURA et al. 2001). Ein erhöhter LF/HF-Quotient deutet demnach auf eine verstärkte sympathische Aktivität hin. Die Aussagekraft dieser Messung ist aber umstritten (KUWAHARA et al. 1996, BERNTSON et al. 1997, VON BORELL et al. 2007).

LF und HF können in Absolutwerten der Leistung (Power in  $\text{ms}^2$ ) oder aber in normalisierten Einheiten (normalized units, n.u.) angegeben werden. Die letztere Darstellung ermöglicht eine bessere Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Individuen, denn sie repräsentiert den relativen Wert der einzelnen Komponenten (HF, LF) im Verhältnis zur Gesamtleistung, minus der VLF-Komponente. Damit wird der Effekt von Veränderungen in der VLF-Komponente oder in der Gesamtleistung minimiert und der wechselseitige Zusammenhang von LF und HF und damit der beiden Komponenten des autonomen Nervensystems herausgehoben (LOMBARDI et al. 1996, TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY 1996).

### **2.4.3. Die Herzfrequenzvariabilität als Schmerzparameter**

Das autonome Nervensystem spielt eine zentrale Rolle bei der physiologischen Antwort auf Stress und Schmerz. Schmerz führt über die Stressantwort zu einer Aktivierung des Sympathikus, der über die Sympathikus-Nebennierenmark-Achse (SN-Achse) die Ausschüttung von Katecholaminen initiiert (GUNNAR and QUEVEDO 2007). Die Analyse der Herzfrequenzvariabilität stellt eine nicht-invasive Methode dar, um die Aktivität des autonomen Nervensystems zu messen (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY 1996).

Untersuchungen zu den Auswirkungen von Schmerz auf die frequenzbezogenen Parameter der HFV zeigen, dass es bei schmerzhaften Zuständen zu einer Erhöhung der LF-Komponente als Maß für eine verstärkte sympathische Aktivität, einer Erniedrigung der HF-Komponente im Sinne eines verminderten vagalen Tonus und zu einer Vergrößerung des LF/HF-Quotienten kommt (RIETMANN et al. 2004a, OEL et al. 2006, STEWART et al. 2008, KOENIG et al. 2014). RIETMANN et al. (2004a) konnten in ihrer Studie an Pferden mit durch Hufrehe bedingten Schmerzen sogar eine Korrelation zwischen den frequenzbezogenen Parameter der HFV und der Schmerzintensität nachweisen. Dabei schien die HF-Komponente ein sensitiverer Marker für die Überwachung der Stressantwort auf Schmerz zu sein als die LF-Komponente. In Ruhe überwiegt der Parasympathikus beim Pferd und eine Verringerung des vagalen Tonus scheint die initiale Antwort auf einen Stressor bzw. Schmerzstimulus mit geringer Intensität zu sein (KUWAHARA et al. 1996, RIETMANN et al. 2004a, RIETMANN et al. 2004b). RIETMANN et al. (2004a) schätzen die Spektralanalyse der HFV als hilfreiches Mittel zur Messung der Stressantwort auf Schmerz ein.

In einer von MEEUSE et al. (2013) durchgeführten Untersuchung aus der Humanmedizin kam es bei Patienten während der Schmerzinduktion durch einen Hitzestimulus zwar ebenfalls zu signifikanten Veränderungen der frequenzbezogenen Parameter der HFV, doch konnten sie keine Korrelation zwischen der LF- und HF-Komponente und der Schmerzintensität nachweisen. Den Autoren nach ist die Messung der HFV zwar zur Schmerzerkennung, nicht aber für die Beurteilung der Schmerzintensität geeignet.

Bei der zeitbezogenen Analyse der HFV wird häufig die RMSSD berechnet. Mit ihr können die hochfrequenten Schwankungen zwischen den Herzschlägen geschätzt werden. Sie ist damit, genau wie die HF-Komponente des Frequenzbereiches, ein Maß für die regulatorische Aktivität des Parasympathikus (VON BORELL et al. 2007). Obwohl bei schmerzhaften Zuständen eine Erniedrigung dieses Parameters anzunehmen wäre, war dies in Untersuchungen zu Pferden und Rindern nicht der Fall (STEWART et al. 2008, ERBER et al. 2012, HALMER et al. 2014). In einer Studie von STEWART et al. (2008) kam es bei 30 Kälbern, die ohne Lokalanästhesie enthornt wurden, zu einem signifikanten Anstieg der LF- und einem Abfall der HF-Komponente im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren. Die RMSSD als zeitbezogener Parameter zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. HALMER et al. (2014) führten ebenfalls eine zeitbezogene Analyse der HFV durch und berechneten die RMSSD bei 12 schmerzbelasteten Pferden mit Hufrehe, die einen Obel Grad von mindestens 1 aufwiesen. Die Autoren führten mehrere Messungen durch und konnten auch hier keinen eindeutigen Unterschied bei Pferden mit Hufrehe gegenüber schmerzfreen Kontrolltieren nachweisen. Sie beurteilen die Messung der HFV zur Schmerzbeurteilung als nur bedingt geeignet (HALMER et al. 2014).

Wie auch andere klinische Kriterien zur Schmerzerkennung können die Parameter der HFV von Faktoren wie psychischem Stress oder Training beeinflusst werden (VOSS et al. 2002, RIETMANN et al. 2004b, SCHMIDT et al. 2010, SMIET et al. 2014). Stresssituationen sollten bei der Messung der HFV zur Schmerzbeurteilung daher vermieden werden (RIETMANN et al. 2004a).

Ein zirkadianer Rhythmus konnte nicht nachgewiesen werden, doch scheinen die LF- und HF-Komponenten in der Nacht höhere Werte aufzuweisen als am Tag (KUWAHARA et al. 1999, EAGER et al. 2004). Das Alter oder das Geschlecht haben wohl keinen Einfluss auf die Parameter der HFV (RIETMANN et al. 2004b, MUNSTERS et al. 2013).

### 3. Tiere, Material und Methoden

Die Versuche wurden unter dem Aktenzeichen G 0056/19 vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt.

#### 3.1. Tiere

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden insgesamt 17 Pferde mit Schmerzen untersucht, die während des normalen Klinikbetriebes in der Pferdeklinik der Freien Universität Berlin vorstellig wurden. Ausgewählt wurden ausschließlich Tiere mit einem Alter von  $\leq 15$  Jahren, die vorberichtlich nicht an einer Pituitary Pars Intermedia Dysfunction litten und auch keine klinischen Anzeichen auf diese Erkrankung zeigten. Solche Symptome wurden definiert als Hypertrichose, Hyperhidrosis, eine abnormale Fettumverteilung und das Vorhandensein eines Senkrückens und Pendelabdomens.

Jedes Tier hatte nach Ankunft in der Klinik mindestens 14 Stunden Zeit, sich an die neue Umgebung zu gewöhnen. Daraufhin wurde bei jedem Pferd eine Untersuchung während des Schmerzzustandes durchgeführt und eine Kontrolluntersuchung, sobald es wieder schmerzfrei war.

Die untersuchten, schmerzbelasteten Pferde ( $n = 17$ ) wurden hinsichtlich ihrer Diagnosen in drei Krankheitsgruppen eingeteilt:

- Krankheitsgruppe 1 (Pferde mit Kolik,  $n = 3$ )
- Krankheitsgruppe 2 (Pferde mit Hufrehe,  $n = 5$ )
- Krankheitsgruppe 3 (Pferde mit einer orthopädischen Erkrankung exklusive Hufrehe,  $n = 9$ )

Einige Pferde mussten chirurgisch versorgt werden, darunter zwei Koliker und fünf Pferde mit einer orthopädischen Erkrankung. In diesen Fällen fand die Probenentnahme stets mehr als 12 Stunden nach dem Aufstehen aus der Narkose statt.

Für die Allgemeinanästhesie erhielten die Pferde als Standardmedikation (Dosierung pro Kilogramm Körpergewicht) für die Prämedikation Acepromazin i.m.<sup>17</sup> (0,03 mg/kg), Amoxicillin i.v.<sup>1</sup> (10 mg/kg), Gentamicin i.v.<sup>2</sup> (6,6 mg/kg), Flunixin i.v.<sup>3</sup> (1,1 mg/kg), Butorphanol i.v.<sup>11</sup> (25  $\mu$ g/kg) und Xylazin i.v.<sup>10</sup> (0,8 mg/kg). Die Narkoseeinleitung erfolgte mit Ketamin i.v.<sup>19</sup>

(2,2 mg/kg) und Diazepam i.v.<sup>18</sup> (0,05 mg/kg). Bei der anschließenden balancierten Narkose wurde zur Erhaltung Isofluran<sup>20</sup> in 100 % Sauerstoff eingesetzt, dazu eine Dauertropfinfusion mit Xylazin<sup>10</sup>. Zur Blutdruckstabilisierung bekamen die Pferde zusätzlich eine Dauertropfinfusion mit Dobutamin<sup>21</sup>. Kurz vor dem Verbringen in die Aufwachbox wurde den Pferden noch einmal Xylazin i.v.<sup>10</sup> (0,3 mg/kg) verabreicht.

Aufgrund ihrer Erkrankungen erhielten alle Pferde auch am Tag der Probenentnahme Medikamente. Die operierten Koliker bekamen als Standardmedikation: Amoxicillin i.v.<sup>1</sup> (10 mg/kg), Gentamicin i.v.<sup>2</sup> (6,6 mg/kg), Flunixin i.v.<sup>3</sup> (1,1 mg/kg), Heparin s.c.<sup>5</sup> (100 I.U./kg) sowie eine Dauertropfinfusion mit Ringer-Infusionslösung<sup>6</sup> (60 ml/kg/Tag) und Glukose 40 %-Infusionslösung<sup>7</sup> (1 g/kg/Tag). Zusätzlich erhielten sie eine Infusion mit Lidocain<sup>8</sup> (Bolus von 1,3 mg/kg über 15 Minuten, danach Dauertropfinfusion mit 0,05 mg/kg/Minute). Einer der beiden operierten Koliker (Pferd Nr. 3) bekam zusätzlich Metamizol i.v.<sup>9</sup> (40 mg/kg). Der konservativ versorgte Koliker (Pferd Nr. 14) wurde behandelt mit Amoxicillin<sup>1</sup> (10 mg/kg), Gentamicin<sup>2</sup> (6,6 mg/kg), Flunixin-Meglumin<sup>3</sup> (1,1 mg/kg), Heparin s.c.<sup>5</sup> (100 I.U./kg) und Ringer-Infusion<sup>6</sup> (60 ml/kg/Tag). Zusätzlich bekam er Xylazin i.v.<sup>10</sup> (0,4 mg/kg), Metamizol i.v.<sup>9</sup> (40 mg/kg) und Butorphanol i.v.<sup>11</sup> (25 µg/kg).

Aus der Gruppe der Pferde mit Hufrehe bekamen drei Tiere Flunixin (0,55 mg/kg), davon zwei intravenös<sup>3</sup> und eines oral<sup>4</sup>. Ein Tier (Pferd Nr. 7) wurde mit Phenylbutazon oral<sup>12</sup> (2,2 mg/kg) behandelt.

Von den Pferden, die aufgrund einer orthopädischen Erkrankung vorgestellt wurden, erfolgte bei fünf Tieren eine antibiotische Behandlung nach chirurgischer Versorgung mit Amoxicillin<sup>1</sup> (10 mg/kg) und Gentamicin<sup>2</sup> (6,6 mg/kg). Drei Pferde erhielten zur Schmerztherapie Flunixin i.v.<sup>3</sup> (1,1 mg/kg), fünf wurden mit Phenylbutazon (2,2 - 4,4 mg/kg) behandelt, vier davon oral<sup>12</sup> und eines intravenös<sup>13</sup>. Ein Tier bekam Morphin i.m.<sup>14</sup> (0,1 mg/kg) und eines Levomethadon i.v.<sup>15</sup> (0,05 mg/kg). Als Magenschutz wurde zwei Pferden zusätzlich Omeprazol<sup>16</sup> (1 mg/kg) oral verabreicht.

Die Medikamentengabe erfolgte mindestens 3 Stunden vor der im Rahmen der vorliegenden Studie durchgeführten Untersuchungen. Eine Ausnahme bildeten die Pferde mit Kolik. Von diesen wurden zwei nach einer Laparotomie untersucht und bekamen während der Probenentnahme eine Infusion mit Ringer<sup>6</sup>, Glukose<sup>7</sup> und Lidocain<sup>8</sup>. Bei dem konservativ behandelten Koliker erfolgte die letzte Medikamentengabe nur eine Stunde vor der Probenentnahme.

## **3.2. Material und Methoden**

### **3.2.1. Zusammenfassung des Versuchsablaufs**

Zu Beginn wurden die Daten des Pferdes in einem Untersuchungsbogen notiert. Nach einer allgemein klinischen Untersuchung erfolgte die Beurteilung der Schmerzintensität nach einer Schmerzskala. Im Anschluss wurde Blut entnommen für die Bestimmung des Blutbildes und der venösen Blutgase. Das gleiche Blut wurde für die Messung des ACTH- und Kortisol-Basalwertes (ACTH 0, Kortisol 0) verwendet. Im Anschluss erfolgte die Durchführung des TRH-Stimulationstests, bei dem den Pferden 30 Minuten nach der intravenösen Applikation von TRH erneut Blut abgenommen wurde für die Bestimmung des ACTH- und Kortisolwertes post TRH (ACTH 30, Kortisol 30). Zum Schluss wurde ein Kurzzeit-EKG für die Analyse der Herzfrequenzvariabilität (HFV) aufgenommen. Bei einigen Pferden wurde das EKG auch vor der Blutentnahme aufgezeichnet. Waren die Pferde wieder schmerzfrei, erfolgte eine Kontrolluntersuchung. Diese erfolgte bei manchen Pferden im heimischen Stall.

### **3.2.2. Untersuchungszeitpunkt**

Aufgrund der jahreszeitlichen Periodik der ACTH-Ausschüttung aus der equinen Hypophyse und des dadurch bedingten physiologischen Anstiegs des Plasma-ACTH im Herbst (DONALDSON et al. 2005) wurden die Untersuchungen in den Monaten November bis Juli durchgeführt. Von August bis einschließlich Oktober wurden keine Proben genommen. Die Untersuchungen erfolgten jeweils zwischen 14:00 und 17:00 Uhr, um eine eventuelle Beeinflussung der Hormone oder der HFV durch einen zirkadianen Rhythmus zu vermeiden und weil zu dieser Zeit meist Ruhe im Stall herrschte, da kaum Behandlungen durchgeführt und auch nicht gefüttert wurde.

### **3.2.3. Untersuchungsbogen**

Zuerst wurde für jedes Pferd das Datum der Ankunft in der Pferdeklinik und das Datum der eigenen Probenentnahme erfasst. Im Anschluss wurden die Daten des Besitzers sowie Name, Rasse, Alter, Geschlecht, Gewicht und Größe des Pferdes bestimmt. Danach wurde die zuvor durch einen Tierarzt der Klinik erhobene Anamnese und die von ihm gestellte Diagnose des Pferdes notiert. Des Weiteren erfolgte die Prüfung des Vorhandenseins der Symptome Hypertrichose, Hyperhidrosis, abnormale Fettumverteilung sowie Senkrücken und

Pendelabdomen, um eine Pituitary Pars Intermedia Dysfunction auszuschließen. Zusätzlich wurde erfasst, ob das Pferd Medikamente bekam. War dies der Fall, wurde die Art des Medikaments, die Dosierung, der Beginn der Medikation, die Häufigkeit und die Zeitpunkte der Gabe sowie die Dauer der Anwendung notiert.

#### **3.2.4. Klinische Allgemeinuntersuchung**

Im Anschluss wurden alle Pferde allgemein klinisch untersucht. Dafür wurden die Körperhaltung und das Verhalten beurteilt, danach die Herz- und Atemfrequenz sowie die innere Körpertemperatur gemessen. Außerdem wurden die Schleimhäute und die kapilläre Füllungszeit begutachtet, die Mandibularlymphknoten palpiert sowie die Darmperistaltik auskultiert.

#### **3.2.5. Beurteilung der Schmerzintensität mithilfe einer Schmerzskala**

Der klinischen Untersuchung schloss sich die Bestimmung der Schmerzintensität an. Durch die Modifizierung bereits veröffentlichter Schmerzbeurteilungsskalen (RIETMANN et al. 2004a, BUSSIÈRES et al. 2008, GRAUBNER et al. 2011, DALLA COSTA et al. 2014) wurde eine zusammengesetzte, multifaktorielle Schmerzskala zur Beurteilung von Schmerzen beim Pferd erstellt.

Diese enthielt neben einem allgemeinen Teil (Tab. 3) auch spezifische Parameter, jeweils für die Pferde mit Koliksymptomatik, Hufrehe und einer orthopädischen Erkrankung exklusive Hufrehe. Es wurden Verhaltenskriterien sowie klinische Parameter beurteilt.

**Tab. 3:** Allgemeiner Teil der Schmerzskala.

Parameter	Wert/Anzeichen	Score
Verhalten/ Bewegungen	Steht entspannt oder zeigt ruhige Bewegungen.	0
	Reduzierte Bewegung oder milde Unruhe.	1
	Widerwille sich zu bewegen oder mittelgradige Unruhe.	2
	Bewegt sich nicht, erscheint introvertiert oder unkontrollierbare Vorwärtsbewegungen.	3
Appetit/ Futteraufnahme	Frisst bereitwillig Heu (trägt evtl. einen Maulkorb).	0
	Frisst nur zögernd Heu.	1
	Zeigt nur geringes Interesse am Heu, frisst nur einige Halme oder nimmt Heu ins Maul aber kaut und schluckt nicht.	2
	Zeigt kein Interesse am Heu und frisst auch keines.	3
Schwitzen	Kein Schwitzen, trockenes Fell.	0
	Fell fühlt sich klamm an.	1
	Fell fühlt sich feucht an, Schweißperlen sichtbar.	2
	Starkes Schwitzen, Schweiß läuft vom Körper.	3
Herzfrequenz	22 - 44	0
	45 - 52	1
	53 - 60	2
	> 60	3
Atemfrequenz	< 20	0
	20 - 24	1
	25 - 30	2
	> 30	3
Innere Körpertemperatur	36,9 - 38,5°C	0
	36,4 - 36,9°C oder 38,5 - 39,0°C	1
	35,9 - 36,4°C oder 39,0 - 39,5°C	2
	35,4 - 35,9°C oder 39,5 - 40,0°C	3

Alle Tiere wurden mit dem allgemeinen Teil sowie den ihrer Erkrankung entsprechenden spezifischen Parametern beurteilt. Für Pferde mit Kolik wurden zusätzlich die Darmmotilität sowie die Verhaltenskriterien Sich-gegen-den-Bauch-treten, Scharren, Kopfbewegungen, Hinlegen/Wälzen und die Reaktion bei der Palpation einer eventuellen Operationswunde evaluiert.

Bei Pferden mit Hufrehe wurden als weitere Parameter die Pulsation der Arteriae digitalis palmaris lateralis und medialis erfasst, die Körperhaltung, der Obel Grad sowie die Reaktion des Pferdes auf die Hufzange bestimmt.

Spezifische Schmerzzeichen für Pferde mit einer orthopädischen Erkrankung außer Hufrehe waren die Körperhaltung, der Lahmheitsgrad sowie die Reaktion des Pferdes auf das Aufheben der kontralateralen Gliedmaße (Abb. 2).



**Abb. 2:** Pferd mit abnormaler Körperhaltung und Entlastung der linken Vordergliedmaße.

Nach der Messung der klinischen Parameter wurden die Pferde insgesamt 5 Minuten lang beobachtet und ihre Verhaltensweisen evaluiert. Für die Bewertung der Lahmheit wurden die Pferde im Schritt und, falls dies möglich war, auch im Trab auf der Geraden beurteilt. Dabei handelte es sich jedes Mal um den gleichen Beobachtenden. Jedes Kriterium wurde in der Regel mit einem numerischen Wert von 0 bis 3 bewertet. 0 bedeutete dabei, dass es keine Abweichungen vom Normalzustand gab, 3 stand für die größtmögliche Modifikation des

Parameters in Anwesenheit von Schmerz. Für manche Kriterien gab es jedoch noch mehr Abstufungen, mit Werten von 0 bis 4 oder 5. So konnte für jedes Pferd eine individuelle Punktzahl ermittelt werden. Diese wurde als Prozentangabe zur maximal zu erreichenden Punktzahl angegeben, um die einzelnen Schmerzintensitäten vergleichen zu können. Anhand festgelegter Prozentgrenzwerte wurden die Schmerzen eingeteilt in:

- nicht vorhanden (0 - 20 %)
- geringgradig (21 - 40 %)
- mittelgradig (41 - 60 %)
- hochgradig (61 - 80 %)
- höchstgradig (81 - 100 %)

Die schmerzbelasteten Pferde wurden im Folgenden nach ihrer Schmerzintensität in Untergruppen eingeteilt:

- Schmerzgruppe 1 (geringgradige Schmerzen, 21 - 41 %)
- Schmerzgruppe 2 (mittelgradige Schmerzen, 41 - 60 %)
- Schmerzgruppe 3 (hochgradige Schmerzen, 61 - 80 %)
- Schmerzgruppe 4 (höchstgradige Schmerzen, 81 - 100 %)

### **3.2.6. Blutuntersuchung**

#### **3.2.6.1. Blutbild und venöse Blutgase**

Die Bestimmung des Blutbildes und der venösen Blutgase diente der weiteren Beurteilung des Gesundheitszustandes des Pferdes. Es wurden der Hämatokrit und das Totalprotein, die Leukozytenzahl, der Laktat- und der pH-Wert bestimmt.

Dazu wurde den Pferden Blut aus der Vena jugularis entnommen. Hatten die Tiere einen Venenverweilkatheter, wurde das Blut hieraus gewonnen. Ansonsten erfolgte die Blutabnahme nach Desinfektion der Punktionsstelle durch Alkohol mittels einer 18 Gauge Sterican®-Einmalkanüle (Firma: B. Braun, Melsungen, Deutschland) sowie einer 20 ml Spritze (Firma: B. Braun, Melsungen, Deutschland).

Das Blut wurde für die Blutbildbestimmung in ein 4 ml Kalium-EDTA-Röhrchen (Firma: Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) überführt. Das Blutbild wurde automatisch erstellt durch den Poch-100iV Diff Blutbildautomaten (Firma: Sysmex, Norderstedt, Deutschland). Lediglich die Ermittlung des Hämatokrits und des Totalproteins erfolgte zusätzlich manuell. Dazu wurde EDTA-Blut in einer Einmal-Mikrohämatokrit-Kapillare (Firma: Hirschmann® Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland) für 3 Minuten bei 12.000 Umdrehungen/Minute in der Heraeus Haemofuge 3522 (Firma: Heraeus, Hanau, Deutschland) zentrifugiert und der Hämatokrit an einer Schablone abgelesen. Das Totalprotein wurde nach Durchbrechen der Kapillare und Aufgeben eines Tropfen Plasmas im Refraktometer abgelesen.

Die Blutgasanalyse wurde nach Umfüllen des zuvor entnommenen Blutes in eine 3 ml BD A-Line™ Calcium-Lithium-Heparin beschichtete Blutgasspritze ohne Nadel (Firma: Becton, Dickinson & Company, Plymouth, United Kingdom) ebenfalls automatisch durch das Cobas b 123 Blutgassystem (Firma: Roche, Mannheim, Deutschland) ausgeführt.

### **3.2.6.2. ACTH und Kortisol**

Für Bestimmung des ACTH-Basalwertes (ACTH 0) wurde ein Teil des zuvor entnommenen Blutes in ein vorgekühltes 4 ml Kalium-EDTA-Röhrchen gefüllt, dieses sofort gekühlt und innerhalb von 10 Minuten mittels der Rotofix 32 Zentrifuge (Firma: Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland) bei 2.500 Umdrehungen/Minute für 10 Minuten zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde unmittelbar mit einer Kunststoff-Pasteurpipette in ein 2 ml Kryogefäß (Firma: Th. Geyer, Renningen, Deutschland) überführt und bei -30°C eingefroren.

Der Kortisol-Basalwert (Kortisol 0) wurde aus dem Serum bestimmt. Dafür wurde ein weiterer Teil des entnommenen Blutes in ein 10 ml Serumröhrchen mit gerinnungsförderndem Granulat (Firma: Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) gefüllt und für 20 - 30 Minuten bei Raumtemperatur zur Gerinnung stehen gelassen. Im Anschluss erfolgte die Trennung der Blutbestandteile in der oben genannten Zentrifuge bei 3.800 Umdrehungen/Minute für 10 Minuten. Das Umfüllen und Einfrieren des Serums erfolgten in gleicher Weise wie beim Plasma (Abb. 3).



**Abb. 3:** Serumröhrchen, Kunststoffpipette sowie Kryoröhrchen mit Serum zur Kortisolbestimmung.

Fand die Probenentnahme nicht in der Pferdeklinik der Freien Universität Berlin, sondern im heimischen Stall der Pferde statt, wurde das entnommene Blut für die ACTH-Bestimmung in ein 5 ml BD Vacutainer®-Aprotinin-Röhrchen (Firma: Becton, Dickinson & Company, Plymouth, United Kingdom) gefüllt. Das für die Kortisolmessung verwendete Blut wurde in einem Serumröhrchen gekühlt. Nach Ankunft in der Pferdeklinik wurden die Proben wie zuvor beschrieben aufbereitet.

Das Plasma sowie das Serum wurden innerhalb von 14 Tagen in einer Kühltransportverpackung an das veterinärmedizinische Labor Synlab.vet in Berlin geschickt. Versendet wurden die Probenröhrchen in einem Kühlakku mit zwei Vertiefungen und Schraubverschluss, der wiederum in einer Styroporbox mit Deckel für die Kälteisolation verstaut wurde. Der vom Labor angegebene obere Grenzwert für ACTH lag bei 36 pg/ml. Der Referenzbereich für Kortisol betrug 30 – 130 ng/ml.

Die Bestimmung von ACTH und Kortisol erfolgte im Labor mittels Chemilumineszenz-Immunassay durch das Immulite® 2000 Immunassay-System (Firma: Siemens, Erlangen, Deutschland).

### **3.2.6.3. TRH-Stimulationstest**

Für den TRH-Stimulationstest erteilten alle Pferdebesitzer ihr Einverständnis. Den Pferden wurde direkt im Anschluss an die Blutentnahme für die ACTH- und Kortisol-Basalwerte 5 ml TRH Ferring 0,2 mg/ml Injektionslösung (Firma: Ferring Arzneimittel, Kiel, Deutschland) intravenös verabreicht. Dies entspricht 1 mg Thyreotropin-Releasing-Hormon. Nach 30 Minuten wurde erneut Blut für die Bestimmung von ACTH und Kortisol entnommen. Diese Proben wurden als ACTH 30 und Kortisol 30 bezeichnet. Die Probenröhrchen sowie die Aufbereitung des Blutes entsprachen dem Vorgehen wie bei den ACTH- und Kortisol-Basalwerten (ACTH 0 und Kortisol 0). Vom Labor wurde für das ACTH, welches 30 Minuten nach TRH-Applikation gemessen wird, ein oberer Grenzwert von 35 pg/ml angegeben. Da die Messung von Kortisol nach TRH-Stimulation nicht mehr empfohlen wird, gab es hierfür keine Referenzbereiche (SCHOTT et al. 2017).

### **3.2.7. Analyse der Herzfrequenzvariabilität**

Zur Analyse der Herzfrequenzvariabilität erfolgte die Aufzeichnung eines Kurzzeit-EKGs. Für die modifizierte bipolare Herzbasis-Herzspitzen-Ableitung wurden vier selbstklebende Skintact®-Klebe-Elektroden (Firma: Leonhard Lang, Innsbruck, Österreich) auf der linken Körperseite des Pferdes platziert. Im Anschluss wurden sie mit den Elektroden des Holter-EKG verbunden. Die Rote (VR) und die Schwarze (Neutral) kamen unterhalb des Widerrists zu liegen, die Gelbe (VL) und die Grüne (HL) im Bereich der Gurtlage, etwa auf Höhe des Ellenbogenhöckers (Abb. 4).



**Abb. 4:** Platzierung der Elektroden bei der EKG-Aufzeichnung.

Bei dem EKG-Gerät handelte es sich um das Televet 100 Telemetric ECG & Holter (Firma: KRUISE, Langeskov, Dänemark). Die Daten wurden per Bluetooth an einen Laptop übermittelt, an dem das EKG mithilfe der Televet-Software in Echtzeit beurteilt werden konnte. Gleichzeitig wurden alle Daten auf einer integrierten Speicherkarte gespeichert. Um störende Signale wie elektromagnetische Wellen elektronischer Geräte zu entfernen, wurde ein 50 Herz (Hz)-Filter aktiviert. Aus den EKG-Daten wurden im Anschluss 2-minütige, störungs- und artefaktfreie Sequenzen herausgeschnitten. Diese Sequenzen wurden im Anschluss einer im Televet Programm integrierten RR-Analyse unterzogen. Dabei wurden automatisch alle Abstände zwischen den R-Zacken berechnet und diejenigen Intervalle markiert, die um mehr als 20 % vom vorherigen RR-Intervall abwichen. Die Daten wurden zusätzlich visuell kontrolliert und die vom Programm falsch erkannten R-Zacken sowie eventuelle weitere Artefakte manuell korrigiert. Die überprüften RR-Intervalle wurden in Millisekunden als txt-Dateien abgespeichert.

Mithilfe der Kubios Herzfrequenzvariabilität-Analysesoftware (Kubios HRV version 2.1, Biosignal Analysis and Medical Imaging Group, University of Eastern Finland, Kuopio, Finnland) wurden aus den txt-Dateien die frequenzbezogenen Parameter der HFV mittels Fast Fourier Transformation (FFT) berechnet.

Von Interesse waren dabei:

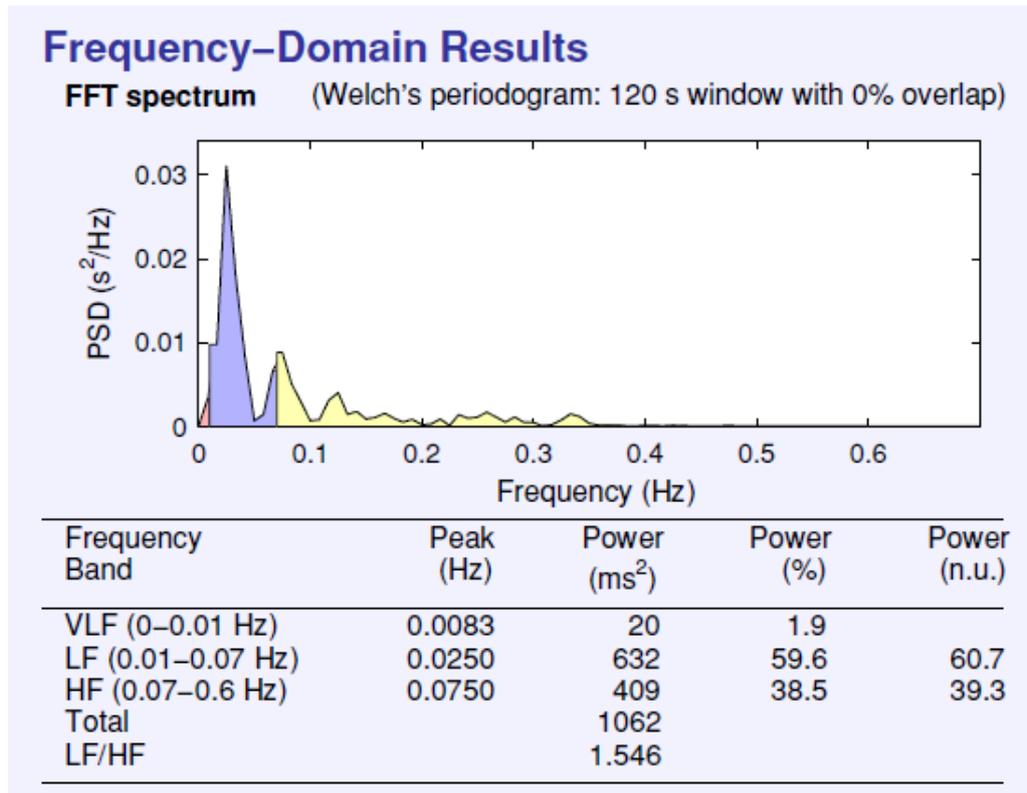
- LF: Die Low Frequency Komponente in normalisierten Einheiten (n.u.)
- HF: Die High Frequency Komponente in normalisierten Einheiten (n.u.)
- LF/HF: das Verhältnis von LF und HF

Die Frequenzbereiche wurden entsprechend KUWAHARA et al. (1996) wie folgt festgelegt:

- LF: 0,01 - 0,07 Hz
- HF: 0,07 - 0,6 Hz

Für die FFT müssen die Zeitabstände zwischen den Messpunkten (hier die RR-Intervalle) über den gesamten Messzeitraum immer gleich sein. Um eine solche gleichförmige Zeitreihe herzustellen, musste die natürlicherweise nicht immer in gleichen Zeitabständen gemessene RR-Intervallserie mittels kubischer Spline-Interpolation bei 4 Hz neu berechnet werden. So entstand eine RR-Intervall-Zeitachse mit einem Messpunkt für jede Viertelsekunde (TARVAINEN et al. 2014).

Das FFT-Spektrum wird durch die Welch's Periodogram Methode berechnet (Abb. 5). Dabei wird der Datensatz in ein oder mehrere sich überlappende Segmente geteilt. Jedes dieser Fenster besitzt eine vom Benutzer festzulegende Breite. Für jedes Segment wird ein FFT-Spektrum berechnet, das Endergebnis stellt den Durchschnitt der verschiedenen Segmente dar. Je länger bzw. breiter ein Fenster ist, desto höher ist die Frequenzauflösung. Wird wiederum der Durchschnitt aus mehreren kurzen Segmenten berechnet, kann so die Varianz der Spektrumschätzung verringert werden (TARVAINEN et al. 2014). Bei den 2 Minuten langen EKG-Sequenzen wurde die Fensterbreite auf 120 Sekunden festgesetzt, mit einer Überlappung von 0 %. So entstand nur ein einzelnes Zeitfenster zur Berechnung des FFT-Spektrums, die Varianz der Spektrumschätzung wurde somit nicht berücksichtigt. Da die Varianz jedoch keinen Einfluss auf die Leistungsschätzungen der Frequenzbereichsparameter hat (TARVAINEN, persönliche Rücksprache) und die Frequenzauflösung bei einem kleineren Zeitfenster als 120 Sekunden zu gering werden würde, war dieser Umstand vertretbar.



**Abb. 5:** Ergebnisse der frequenzbezogenen Analyse mittels Fast Fourier Transformation (FFT) aus der Kubios HRV Software. Die blauen Zacken repräsentieren die LF-Komponente, die gelben die HF-Komponente.

Um eventuell störende niederfrequente Trendlinien aus der RR-Intervallserie zu entfernen, wurde eine Trendlinienbereinigung mittels der Smoothness-Prior-Methode durchgeführt. Dieser Hochpassfilter lässt nur Signale durch, die eine höhere Frequenz besitzen als ein bestimmter Cut-off-Wert und schwächt Signale ab, die unterhalb des Grenzwertes liegen. Dieser wurde mit Lambda festgelegt. Je höher Lambda, desto niedriger der Cut-off-Wert (TARVAINEN et al. 2014). In der vorliegenden Studie wurde Lambda auf 5000 gesetzt. Dies ergibt einen Cut-off-Wert von 0,016 Hz (FAUST 2015). Somit wurde der Teil des verwendeten LF-Bereichs abgeschnitten, dessen Untergrenze bei 0,01 Hz lag. Da sich mit dem Programm jedoch kein höheres Lambda und damit ein Cut-off-Wert von unter 0,01 Hz erzielen ließ und die Very Low Frequency Komponente mit noch niedrigeren Frequenzbereichen für die vorliegende Studie nicht von Bedeutung war, wurde die Einstellung beibehalten.

### **3.2.8. Kontrolluntersuchungen**

Waren die Pferde wieder schmerzfrei, wurden Kontrolluntersuchungen durchgeführt, um den Einfluss von Schmerz auf das endokrine und autonome System beurteilen zu können. Musste ein Pferd aufgrund seiner Grunderkrankung euthanasiert werden, bevor eine Kontrolluntersuchung möglich war, wurde es nicht in die Berechnungen zum Vergleich zwischen Schmerzzustand und Kontrolle mit einbezogen. Die Vergleiche erfolgten nur mit den Pferden, die überlebten. Diese wurden als „Vergleichsgruppe“ bezeichnet.

Von diesen Pferden wurden zwei vor der Kontrolluntersuchung nach Hause entlassen. Die Probenentnahme erfolgte daher außerhalb der Klinik im heimischen Stall.

Am Tag der Kontrolluntersuchung bekam ein Pferd (Pferd Nr. 8) Phenylbutazon oral (1,1 mg/kg) verabreicht.

### **3.3. Statistische Auswertung**

Zur statistischen Auswertung wurde das Computerstatistikprogramm IBM® SPSS Statistics Version 23 (SPSS Inc., Chicago Illinois, USA) verwendet. Die Analyse erfolgte mithilfe von PD Dr. med. vet. Roswita Merle von dem Institut für Veterinär-Epidemiologie und Biometrie der Freien Universität Berlin.

Zunächst erfolgte die Prüfung der Daten auf Normalverteilung mithilfe einer explorativen Datenanalyse und dem Kolmogorov-Smirnov Test.

Für den Vergleich zwischen Schmerzzustand und Kontrolle bezüglich der Parameter der klinischen Allgemeinuntersuchung, der Blutuntersuchung sowie von ACTH und Kortisol vor und nach TRH-Stimulation wurden nur die Pferde der Vergleichsgruppe in die Berechnungen mit einbezogen, also nur diejenigen Pferde, von denen eine Kontrolluntersuchung vorlag. Es handelte sich um gepaarte, abhängige Stichproben. Ob es einen statistisch signifikanten Unterschied der verschiedenen gemessenen Parameter zwischen Schmerzzustand und Kontrolle gab, wurde mit dem T-Test für gepaarte Stichproben berechnet. Bei nicht normalverteilten Daten wurde der nicht-parametrische Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben verwendet. Ob der Schmerz einen Einfluss auf die Höhe des ACTH-Anstiegs nach TRH-Stimulation hatte, wurde mithilfe der Variable ACTH Diff (ACTH 30 - ACTH 0) berechnet und durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben

getestet. Zusätzlich erfolgte durch lineare Regression die Prüfung der Fragestellung, ob die Höhe der Schmerzintensität einen Einfluss auf die Höhe der ACTH- und Kortisolwerte vor und nach TRH-Stimulation hatte. Dies wurde mit allen untersuchten schmerzbelasteten Pferden berechnet.

Auch für die frequenzbezogenen Parameter der HFV wurde mithilfe des T-Tests bzw. des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für gepaarte Stichproben zunächst untersucht, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen dem Schmerzzustand und der Kontrolle gab, wobei wieder nur die Pferde der Vergleichsgruppe in die Berechnungen mit einfließen. Zusätzlich wurde geprüft, ob die Parameter der HFV mit der Schmerzintensität korrelierten und dazu der Pearson- bzw. Spearman-Rank-Korrelationskoeffizient berechnet. Im Anschluss wurde eine lineare Regression durchgeführt, um zu testen, ob die Intensität des Schmerzes einen Einfluss auf die HFV hatte.

Des Weiteren wurden die Pferde der verschiedenen Schmerzgruppen bezüglich der ACTH- und Kortisolwerte vor und nach TRH-Stimulation sowie der frequenzbezogenen Parameter der HFV miteinander verglichen. Dazu wurde bei normalverteilten Daten der T-Test für unabhängige Stichproben, bei nicht normalverteilten Daten der Mann-Whitney-Test verwendet.

Ob sich die ACTH- und Kortisolwerte sowie die Parameter der HFV bei den verschiedenen Krankheitsgruppen (Kolik, Hufrehe, orthopädische Erkrankung) unterschieden, wurde mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests geprüft.

Das Level der Signifikanz ( $\alpha$ ) wurde auf 0,05 festgelegt. Es galt:

$p \geq 0,05$ : nicht signifikant

$p < 0,05$ : signifikant

$p < 0,01$ : hoch signifikant

$p < 0,001$ : höchst signifikant

Die grafische Darstellung der Daten erfolgte mithilfe von Microsoft® Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

## 4. Ergebnisse

Von den 17 untersuchten Tieren wurden zwei aus den Berechnungen ausgeschlossen. Ein Pferd wurde wegen Ausreißerwerten nicht in die Statistik mit einbezogen. Bei dem zweiten Tier bestand während des Studienverlaufs der Verdacht auf eine PPID-Erkrankung. Es zeigte während der Kontrolluntersuchung im Vergleich zum Schmerzzustand deutlich erhöhte und über dem Referenzbereich liegende ACTH-Werte nach TRH-Stimulation, die bei wiederholter Messung weiter anstiegen. Außerdem entwickelte es klinische Anzeichen einer PPID. Daher wurde auch dieses Pferd nicht in den Berechnungen berücksichtigt.

Nach Ausschluss der oben genannten Tiere wurden 15 schmerzbelastete Pferde in die Studie integriert. Von diesen mussten sechs Pferde aufgrund ihrer Grunderkrankung im Verlauf euthanasiert werden, bevor sie schmerzfrei waren und eine Kontrolluntersuchung möglich war. Die Vergleichsgruppe umfasste daher nur neun Pferde.

### 4.1. Tests auf Normalverteilung

Die Werte von ACTH waren überwiegend normalverteilt, sodass die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen angegeben und parametrische Tests angewendet wurden. Lediglich die Datengruppe der Variable *ACTH Diff* war nicht normalverteilt, sodass hier ein nicht-parametrischer Test verwendet wurde.

Die Werte von Kortisol waren während des Schmerzzustandes nicht normalverteilt, während der Kontrolluntersuchung waren sie jedoch normalverteilt. Trotzdem wurden für die Vergleiche zwischen Schmerzzustand und Kontrolle der Median mit Minimal- und Maximalwerten angegeben und nicht-parametrische Tests angewendet.

Von den frequenzbezogenen Parametern der Herzfrequenzvariabilität waren die Werte der LF- und HF-Komponente normalverteilt, die Daten der LF/HF-Ratio hingegen waren nicht normalverteilt.

Zum Vergleich zwischen den verschiedenen Krankheitsgruppen wurden alle Daten als nicht normalverteilt betrachtet, da die Stichprobengröße der einzelnen Gruppen sehr gering war.

## 4.2. Geschlecht, Rasse, Größe, Gewicht, Alter und Diagnosen

### 4.2.1. Alle Pferde mit Schmerzen

Geschlecht, Rasse, Größe, Gewicht, Alter und die Diagnosen der untersuchten schmerzbelasteten Pferde (n = 15) sind in Tabelle 4 dargestellt.

**Tab. 4:** Daten der untersuchten schmerzbelasteten Pferde (n = 15).

Pferd (Ifde. Nr.)	Geschlecht	Rasse	Größe in cm	Gewicht in kg	Alter in Jahren	Diagnose
1	mk*	Warmblut	151	413	8	Fraktur
2 <sup>k</sup>	w**	Pony	127	301	7	OCD
3	mk	Warmblut	174	542	8	Kolik
4	mk	Warmblut	165	484	12	Arthrose
5	w	Warmblut	176	643	15	Fraktur
6 <sup>k</sup>	w	Vollblut	166	489	9	Phlegmone
7 <sup>k</sup>	w	Pony	123	196	14	Hufrehe
8 <sup>k</sup>	mk	Warmblut	152	450	14	Hufrehe
9	mk	Warmblut	184	750	15	Fesselträgerschenkel-desmopathie
10 <sup>k</sup>	w	Pony	109	184	7	Hufrehe
11 <sup>k</sup>	mk	Warmblut	172	476	9	Fraktur
12 <sup>k</sup>	mk	Warmblut	164	516	12	Hufrehe
13 <sup>k</sup>	mk	Warmblut	175	572	5	Septische Arthritis
14	mk	Warmblut	179	593	6	Kolik
15 <sup>k</sup>	mk	Kaltblut	169	650	11	Arthrose

k = Pferde, bei denen eine Kontrolluntersuchung möglich war

\*mk = männlich, kastriert

\*\*w = weiblich

Es handelte sich um zehn Wallache und fünf Stuten unterschiedlicher Rassen (1 Kaltblut, 10 Warmblüter, 1 Vollblut, 3 Ponys), mit einer durchschnittlichen Größe von  $159 \pm 23$  cm (109 - 184 cm) und einem durchschnittlichen Gewicht von  $484 \pm 160$  kg (184 - 750 kg). Das Durchschnittsalter lag bei  $10 \pm 3$  Jahren (5 - 15 Jahre).

Von den Pferden litten zwei an einer Kolik, bei vier Pferden wurde eine Hufrehe diagnostiziert und neun Tiere hatten eine orthopädische Erkrankung. Einer der beiden Koliker (Pferd Nr. 3)

musste aufgrund einer Hernia inguinalis incarcerata chirurgisch versorgt werden. Der andere Koliker (Pferd Nr. 14) litt an einer primären Magenüberladung mit hochgradigem Zaecummeteorismus und wurde konservativ behandelt. Bei drei der vier Pferde mit Hufrehe waren beide Vordergliedmaßen betroffen (Pferd Nr. 8, 10, 12), ein Tier hatte Hufrehe auf allen vier Gliedmaßen (Pferd Nr. 7). Zu den orthopädischen Erkrankungen gehörten drei Frakturen (Pferd Nr. 1, 5, 11), zwei Arthrosen (Pferd Nr. 4, 15), eine septische Arthritis (Pferd Nr. 13), eine Osteochondrosis dissecans (OCD) (Pferd Nr. 2), eine Phlegmone (Pferd Nr. 6) und eine Desmopathie beider Fesselträgerschenkel (Pferd Nr. 9). Aus dieser Gruppe wurden fünf Pferde aufgrund ihrer Erkrankung operiert (Pferd Nr. 1, 4, 5, 11, 13).

#### **4.2.2. Vergleichsgruppe**

Von den 15 untersuchten schmerzbelasteten Pferden mussten sechs euthanasiert werden, bevor eine Kontrolluntersuchung möglich war (Pferd Nr. 1, 3, 4, 5, 9, 14). Die Vergleichsgruppe umfasste damit nur neun Tiere (Pferd Nr. 2, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15). Dazu gehörten fünf Wallache und vier Stuten unterschiedlicher Rassen (1 Kaltblut, 4 Warmblüter, 1 Vollblut, 3 Ponys). Die durchschnittliche Größe betrug  $151 \pm 25$  cm (109 - 175 cm), das durchschnittliche Gewicht lag bei  $426 \pm 163$  kg (184 - 650 kg) und das durchschnittliche Alter betrug  $10 \pm 3$  Jahre (5 - 14 Jahre).

### 4.3. Herzfrequenz, Atemfrequenz und innere Körpertemperatur

#### 4.3.1. Vergleichsgruppe

Der Median sowie die Minimum- und Maximumwerte für die Herzfrequenz der Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9) während des Schmerzzustandes und während der Kontrolle sind in Tabelle 5 dargestellt. Der Median der Herzfrequenz war mit 40 Schlägen pro Minute während des Schmerzzustandes und der Kontrolle gleich.

**Tab. 5:** Herzfrequenzen der Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9).

Herzfrequenz (Schläge/Minute)		
	Schmerzen	Kontrolle
Median	40	40
Minimum	36	28
Maximum	92	52

Bezüglich der Atemfrequenz kam es zu einer Erhöhung des Medians während des Schmerzzustandes (Tab. 6). Dies war jedoch nicht signifikant.

**Tab. 6:** Atemfrequenzen der Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9).

Atemfrequenz (Atemzüge/Minute)		
	Schmerzen	Kontrolle
Median	20	16
Minimum	12	8
Maximum	88	32

Nur die innere Körpertemperatur war während des Schmerzzustandes signifikant höher ( $p = 0,012$ ) als bei der Kontrolle (Tab. 7).

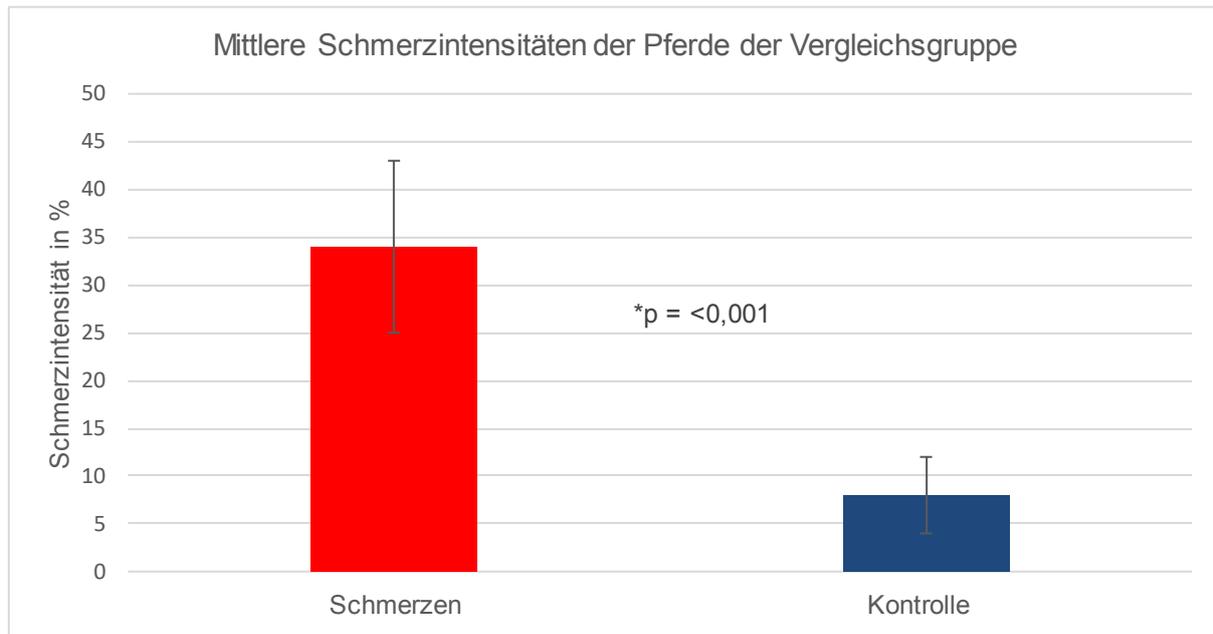
**Tab. 7:** Innere Körpertemperatur der Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9).

Innere Körpertemperatur (°C)		
	Schmerzen	Kontrolle
Median	37,9	37,6
Minimum	37,6	37,2
Maximum	38,7	37,7

## 4.4. Schmerzintensität

### 4.4.1. Vergleichsgruppe

In der Vergleichsgruppe ( $n = 9$ ) war die Schmerzintensität der Pferde während des Schmerzzustandes (Mittelwert  $34 \pm 9$  %) signifikant höher als bei der Kontrolluntersuchung (Mittelwert  $8 \pm 4$  %), mit  $p = < 0,001$  (Abb. 6).



**Abb. 6:** Grafische Darstellung der mittleren Schmerzintensitäten der Pferde der Vergleichsgruppe ( $n = 9$ ) mit Schmerzen und bei der Kontrolle. Die Pferde zeigten während des Schmerzzustandes eine signifikant höhere ( $p = < 0,001$ ) Schmerzintensität als bei der Kontrolluntersuchung. Der Fehlerbalken entspricht  $\pm 1$  Standardabweichung.

Während des Schmerzzustandes zeigten sieben Pferde eine Schmerzintensität von 21 - 40 % und litten somit an geringgradigen Schmerzen. Bei zwei Pferden waren die Schmerzen mittelgradig mit einer Schmerzintensität von 41 - 60 %.

Bei der Kontrolluntersuchung hatten alle Tiere eine Schmerzintensität von 0 - 20 % und somit nicht vorhandene Schmerzen.

## 4.5. Hämatokrit, Totalprotein, Leukozytenzahl, Laktat und pH-Wert

### 4.5.1. Vergleichsgruppe

Die durchschnittlichen Werte der Blutparameter Hämatokrit, Totalprotein, Leukozytenzahl, Laktat und pH-Wert für die Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9) sind in Tabelle 8 dargestellt.

**Tab. 8:** Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) der Blutparameter der Vergleichsgruppe (n = 9).

Parameter	Schmerzen	Kontrolle
Hämatokrit (%)	33,8 ( $\pm$ 3,9)	34,6 ( $\pm$ 4,3)
Totalprotein (g/dl)	6,8 ( $\pm$ 0,4)	6,8 ( $\pm$ 0,7)
Leukozytenzahl ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	7,2 ( $\pm$ 3,6)	7,7 ( $\pm$ 1,4)
Laktat (mmol/l)	1,0 ( $\pm$ 0,9)	0,5 ( $\pm$ 0)
pH-Wert	7,38 ( $\pm$ 0,03)	7,37 ( $\pm$ 0,03)

Lediglich der pH-Wert unterschied sich statistisch signifikant zwischen beiden Untersuchungen ( $p = 0,008$ ) und war während des Schmerzzustandes (Mittelwert  $7,38 \pm 0,03$ ) höher als bei der Kontrolle (Mittelwert  $7,37 \pm 0,03$ ).

## 4.6. ACTH

### 4.6.1. ACTH-Basalwert (ACTH 0)

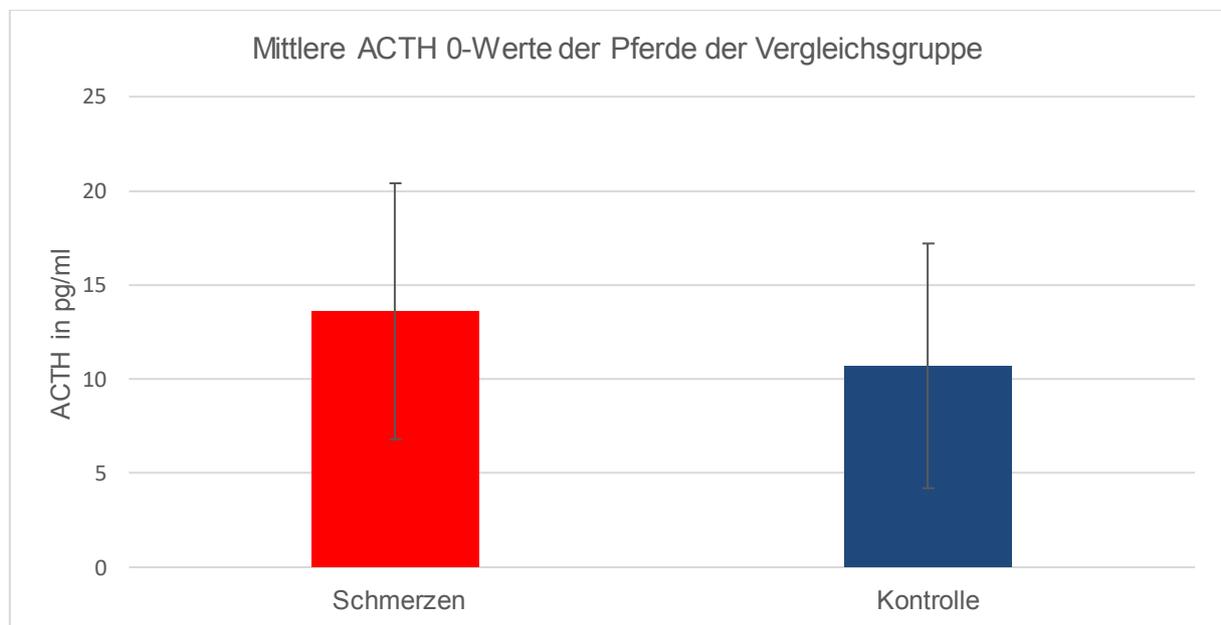
#### 4.6.1.1. Alle Pferde mit Schmerzen

Der durchschnittliche ACTH-Basalwert (ACTH 0) aller 15 schmerzbelasteten Pferde lag bei  $12,8 \pm 6,2$  pg/ml (5,0 - 24,8 pg/ml).

Bei keinem der Tiere lag der ACTH 0-Wert über dem vom Labor Synlab.vet in Berlin angegebenen oberen Grenzwert für ACTH von 36 pg/ml, der auf eine PPID-Erkrankung hindeuten würde.

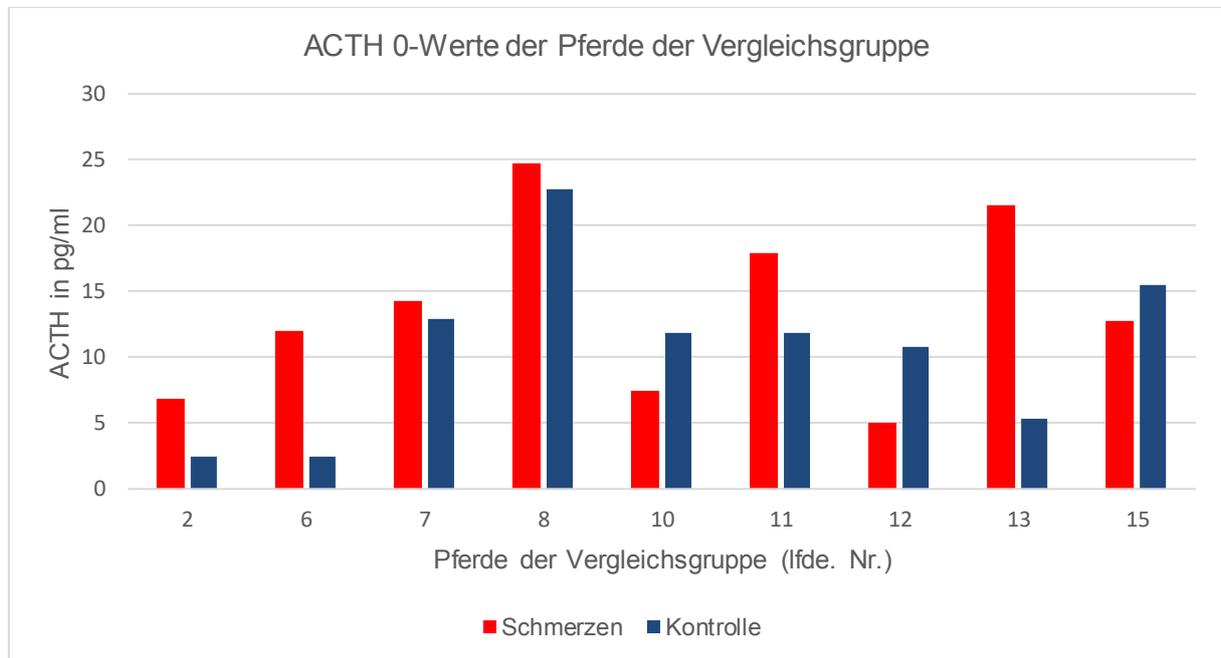
#### 4.6.1.2. Vergleichsgruppe

In der Vergleichsgruppe (n = 9) lag ACTH 0 im Mittel bei den Pferden mit Schmerzen (Mittelwert  $13,6 \pm 6,8$  pg/ml) höher als während der Kontrolluntersuchung (Mittelwert  $10,7 \pm 6,5$  pg/ml). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 7).



**Abb. 7:** Grafische Darstellung der mittleren ACTH 0-Werte der Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9) mit Schmerzen und bei der Kontrolle. Das gemessene ACTH 0 war während des Schmerzzustandes höher als bei der Kontrolluntersuchung. Dies war jedoch statistisch nicht signifikant. Der Fehlerbalken entspricht  $\pm 1$  Standardabweichung.

Bei drei Tieren der Vergleichsgruppe (Pferd Nr. 10, 12, 15) wurde während des Schmerzzustandes ein niedrigerer ACTH 0-Wert als bei der Kontrolluntersuchung gemessen (Abb. 8).

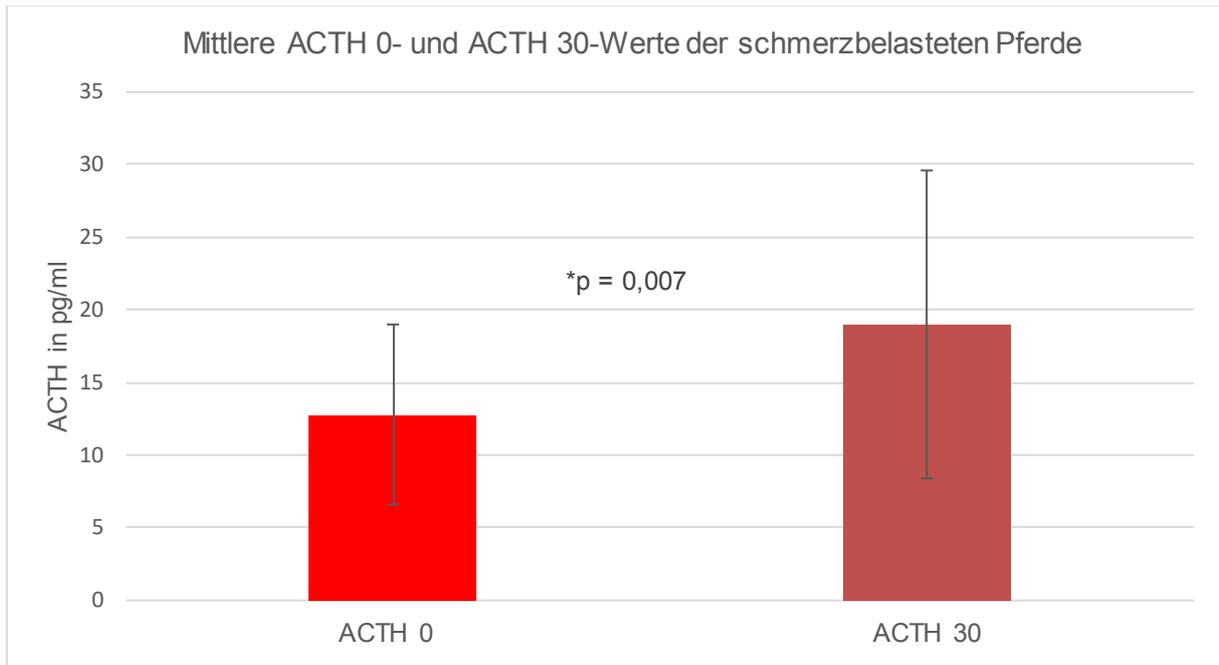


**Abb. 8:** Vergleich der ACTH-Basalwerte (ACTH 0) der einzelnen Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9) während des Schmerzzustandes und der Kontrolle. Davon zeigten drei Tiere (Pferd Nr. 10, 12, 15) einen niedrigeren ACTH 0-Wert während des Schmerzzustandes als bei der Kontrolluntersuchung. Die laufenden Nummern der Pferde sind als Nummerierung angegeben.

#### 4.6.2. TRH-Stimulationstest (ACTH 30)

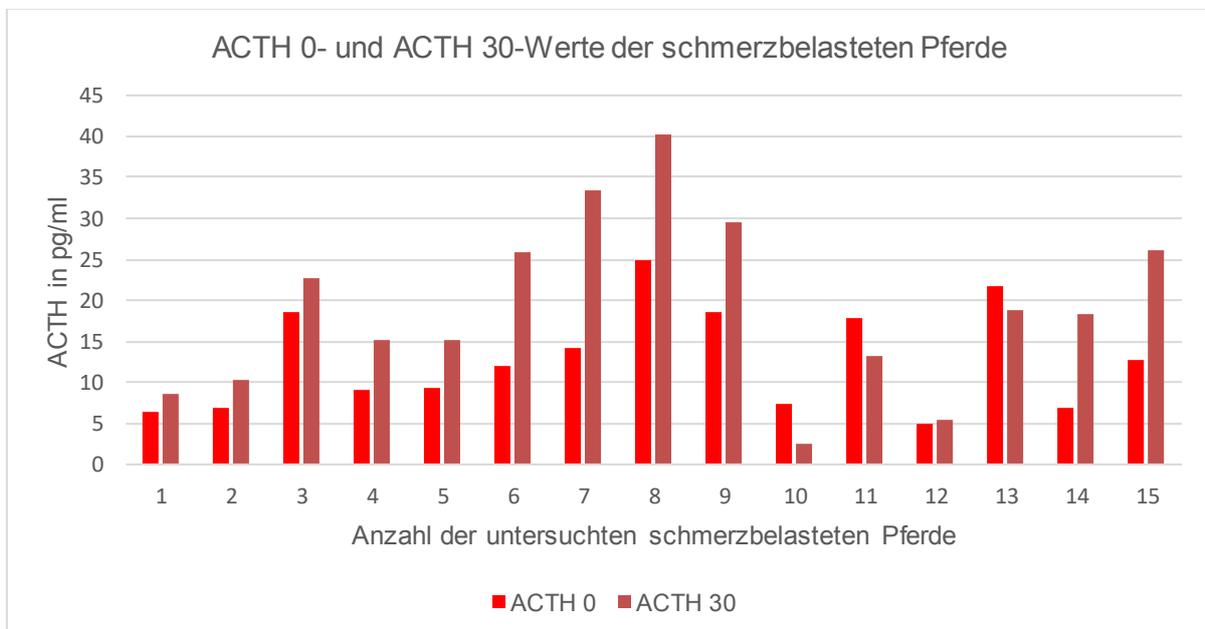
Nach der intravenösen Applikation von TRH zeigten manche Pferde ein vorübergehendes Gähnen oder Flehmen.

Zunächst wurde geprüft, ob und inwieweit die Applikation von TRH zu einem Anstieg des Plasma-ACTH führte. Das 30 Minuten nach der TRH-Stimulation gemessene ACTH wurde als ACTH 30 bezeichnet. Bei den untersuchten schmerzbelasteten Pferden (n = 15) kam es nach der Applikation von TRH insgesamt zu einem signifikanten Anstieg ( $p = 0,007$ ) von ACTH 30 (Mittelwert  $19 \pm 10,6$  pg/ml) im Vergleich zu ACTH 0 (Mittelwert  $12,8 \pm 6,2$  pg/ml) (Abb. 9).



**Abb. 9:** Grafische Darstellung der mittleren ACTH 0- und ACTH 30-Werte der schmerzbelasteten Pferde (n = 15). Nach TRH-Applikation kam es zu einem signifikanten Anstieg von ACTH 30 (p = 0,007). Der Fehlerbalken entspricht ± 1 Standardabweichung.

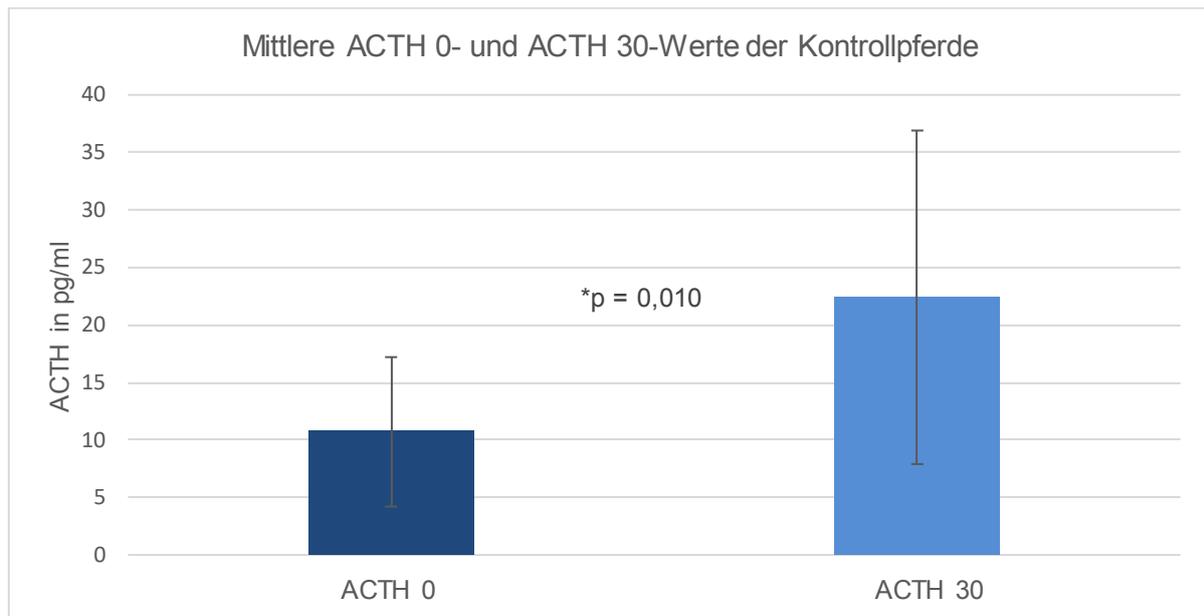
Bei drei Tieren (Pferd Nr. 10, 11, 13) sank der ACTH-Wert nach TRH-Stimulation, anstatt zu steigen (Abb. 10).



**Abb. 10:** ACTH-Basalwerte (ACTH 0) und ACTH nach TRH-Stimulation (ACTH 30) der einzelnen schmerzbelasteten Pferde (n = 15). Bei drei Tieren (Pferd Nr. 10, 11, 13) sank der ACTH-Wert 30 Minuten nach der Applikation von TRH.

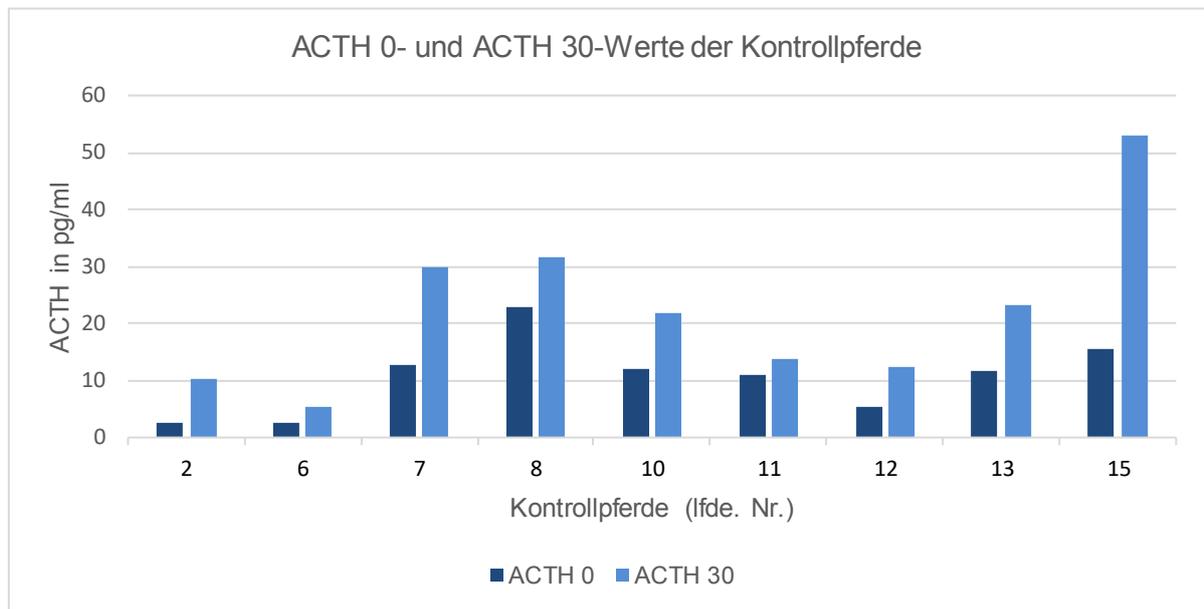
Bei einem Tier (Pferd Nr. 8) stieg der ACTH 30-Wert auf 40,2 pg/ml und lag damit über dem vom Labor Synlab.vet in Berlin angegebenen oberen Grenzwert von 35 pg/ml für ACTH, welches 30 Minuten nach einer TRH-Stimulation gemessen wird.

Bei den Kontrolltieren (n = 9) kam es ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg ( $p = 0,010$ ) von ACTH 30 (Mittelwert  $22,4 \pm 14,5$  pg/ml) im Vergleich zu ACTH 0 (Mittelwert  $10,7 \pm 6,5$  pg/ml) (Abb. 11).



**Abb. 11:** Grafische Darstellung der mittleren ACTH 0- und ACTH 30-Werte der Kontrollpferde (n = 9). Nach TRH-Applikation kam es zu einem signifikanten Anstieg von ACTH 30 ( $p = 0,010$ ). Der Fehlerbalken entspricht  $\pm 1$  Standardabweichung.

Dabei zeigte jedes Pferd einen Anstieg des ACTH-Wertes 30 Minuten nach TRH-Applikation (Abb. 12).

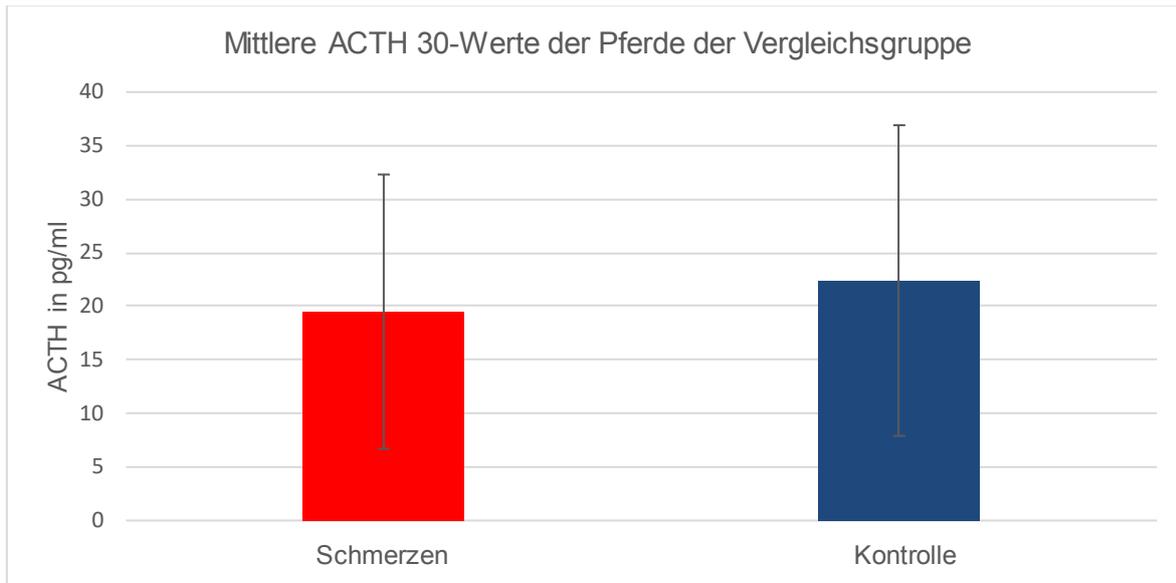


**Abb. 12:** ACTH-Basalwerte (ACTH 0) und ACTH nach TRH-Stimulation (ACTH 30) der einzelnen Kontrollpferde (n = 9). Bei allen Tieren stieg der ACTH-Wert nach TRH-Stimulation an. Die laufenden Nummern der Pferde sind als Nummerierung angegeben.

Bei einem der Kontrollpferde (Pferd Nr. 15) stieg der ACTH 30-Wert auf 52,9 pg/ml und lag damit über dem vom Labor Synlab.vet in Berlin für die PPID-Diagnostik angegebenen oberen Grenzwert von 36 pg/ml, für das 30 Minuten nach TRH-Stimulation gemessene ACTH.

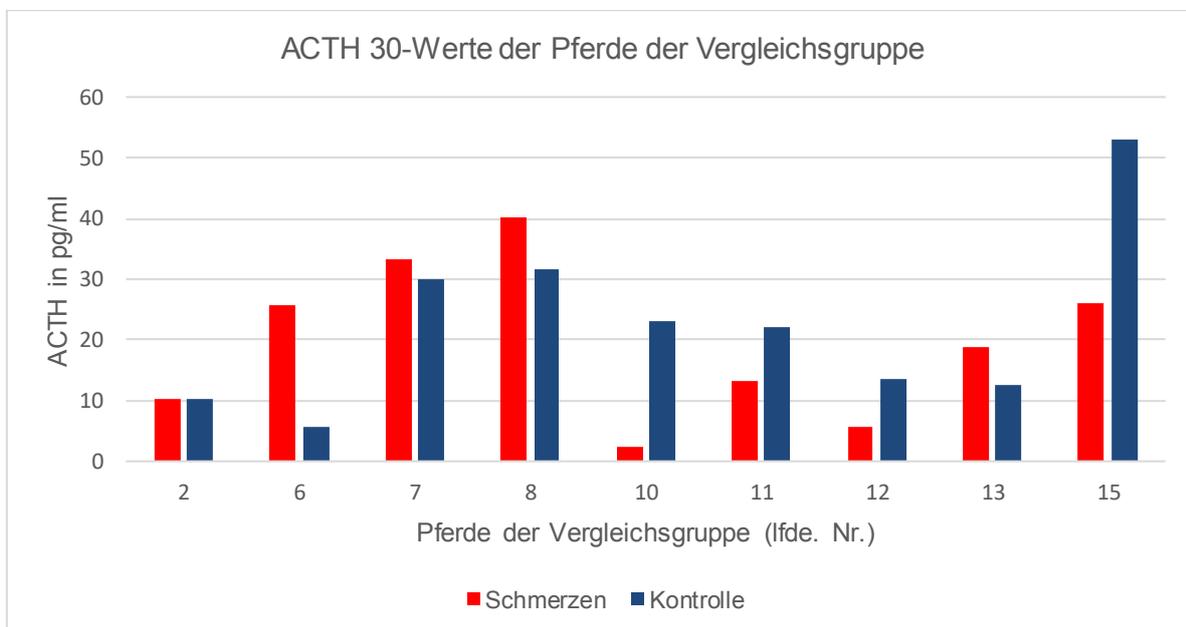
#### 4.6.2.1. Vergleichsgruppe

In der Vergleichsgruppe (n = 9) war der durchschnittliche ACTH 30-Wert während des Schmerzzustandes insgesamt geringgradig niedriger (Mittelwert  $19,5 \pm 12,8$  pg/ml) als bei der Kontrolluntersuchung (Mittelwert  $22,4 \pm 14,5$  pg/ml). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 13).



**Abb. 13:** Grafische Darstellung der mittleren ACTH 30-Werte der Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9) mit Schmerzen und bei der Kontrolle. Das gemessene ACTH 30 war während des Schmerzzustandes geringer als bei der Kontrolluntersuchung. Dies war jedoch statistisch nicht signifikant. Der Fehlerbalken entspricht  $\pm 1$  Standardabweichung.

Bei fünf Tieren (Pferd Nr. 2, 10, 11, 12, 15) konnte während des Schmerzzustandes ein geringerer ACTH 30-Wert gemessen werden als bei der Kontrolluntersuchung (Abb. 14).



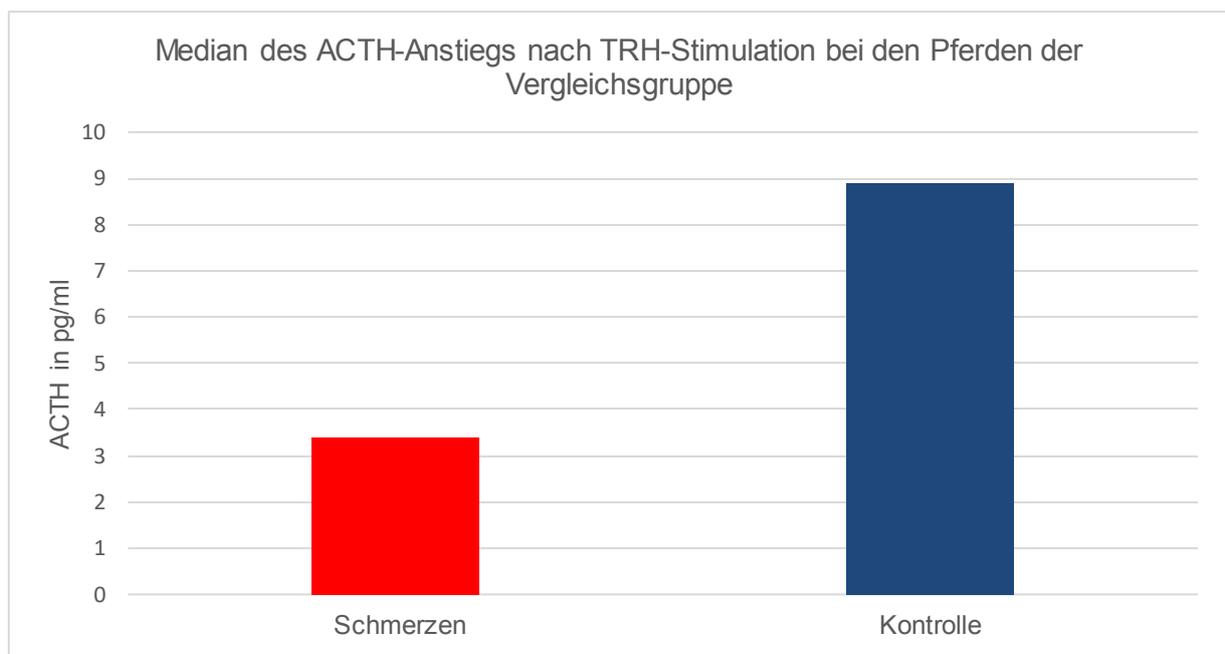
**Abb. 14:** Vergleich der ACTH-Werte nach TRH-Stimulation (ACTH 30) der einzelnen Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9) während des Schmerzzustandes und der Kontrolle. Bei fünf Pferden (Pferd Nr. 2, 10, 11, 12, 15) wurde ein niedrigerer ACTH 30-Wert während des Schmerzzustandes als bei der Kontrolluntersuchung gemessen. Die laufenden Nummern der Pferde sind als Nummerierung angegeben.

### 4.6.3. ACTH-Anstieg

Es wurde ebenfalls untersucht, ob es einen Unterschied zwischen dem Schmerzzustand und der Kontrolluntersuchung bezüglich der Stärke des ACTH-Anstiegs nach TRH-Stimulation gab. Dieser Anstieg berechnete sich aus der Differenz von ACTH 30 minus ACTH 0 und wurde mit der Variable ACTH Diff ausgedrückt.

#### 4.6.3.1. Vergleichsgruppe

In der Vergleichsgruppe (n = 9) war der durchschnittliche ACTH-Anstieg nach TRH-Stimulation (ACTH Diff) während des Schmerzzustandes (Median 3,4 pg/ml, Minimum -4,9 pg/ml, Maximum 19,1 pg/ml) geringer als bei der Kontrolluntersuchung (Median 8,9 pg/ml, Minimum 2,9 pg/ml, Maximum 37,4 pg/ml). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 15).

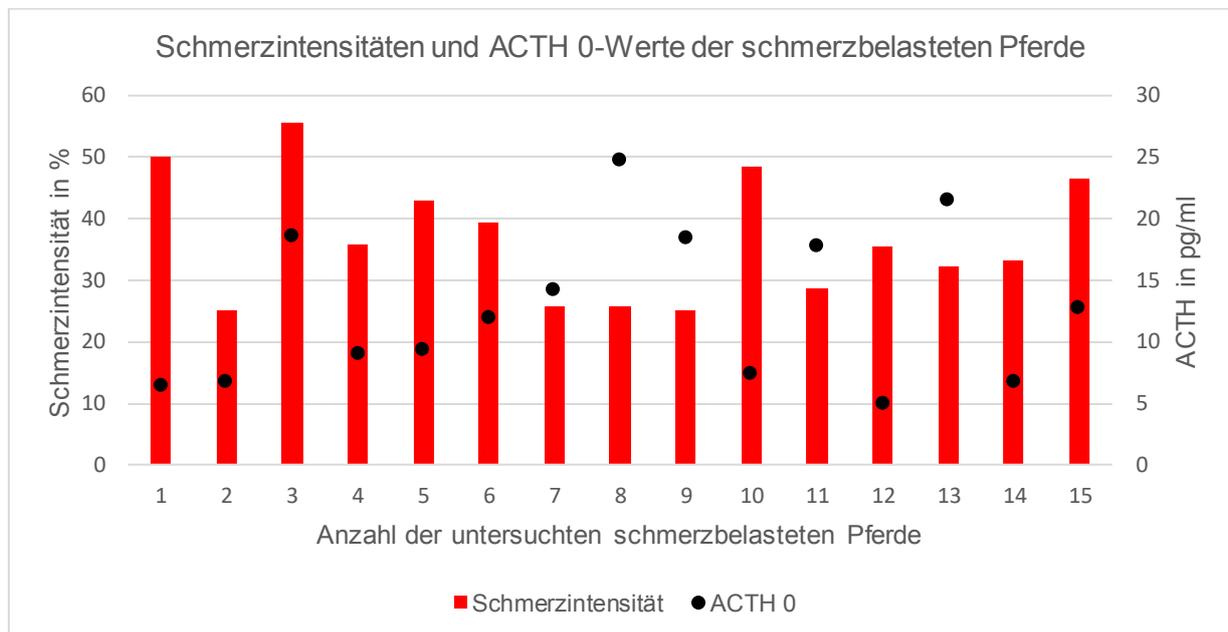


**Abb. 15:** Grafische Darstellung der Mediane des ACTH-Anstiegs nach TRH-Stimulation bei den Pferden der Vergleichsgruppe (n = 9) mit Schmerzen und bei der Kontrolle. Der Anstieg des ACTHs war während des Schmerzzustandes geringer als bei der Kontrolluntersuchung. Dies war aber statistisch nicht signifikant.

#### 4.6.4. Einfluss der Schmerzintensität auf ACTH

##### 4.6.4.1. ACTH 0

Ob die Intensität des Schmerzes einen Einfluss auf die Höhe des ACTH-Basalwertes (ACTH 0) hatte, wurde mit einer linearen Regression geprüft. Dafür wurden alle untersuchten Pferde mit Schmerzen (n = 15) in die Berechnungen mit einbezogen. Die Abbildung 16 zeigt die Höhe der Schmerzintensitäten der schmerzbelasteten Pferde und die jeweils dazugehörigen ACTH 0-Werte.



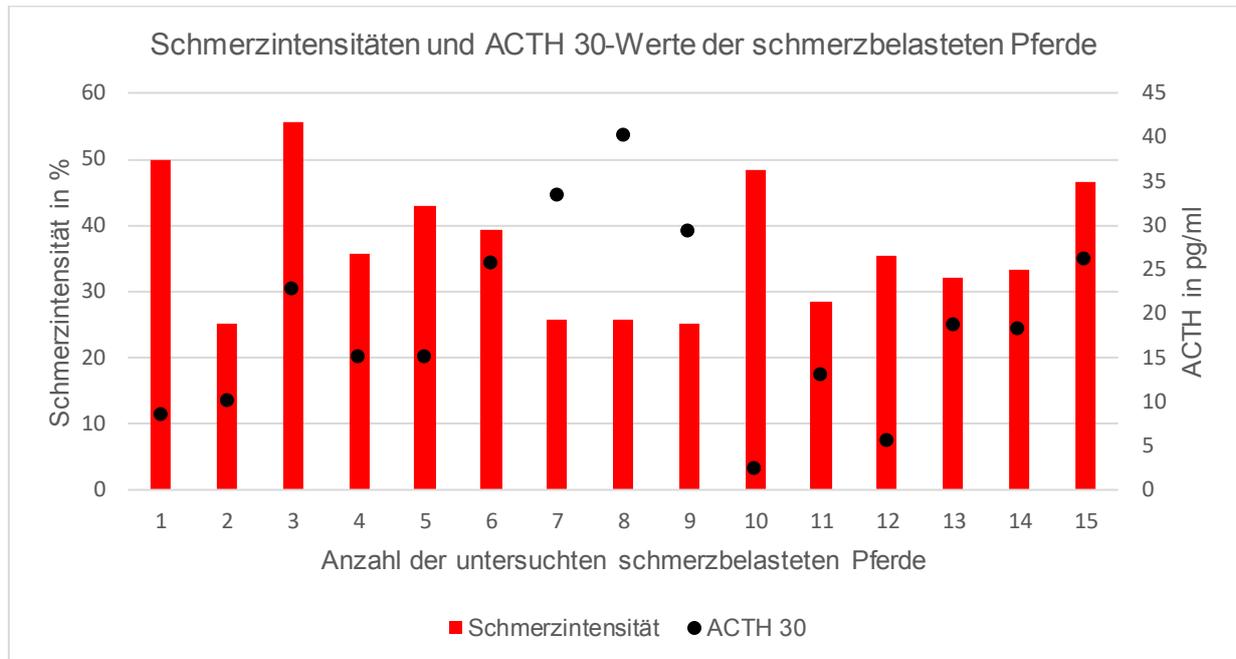
**Abb. 16:** Die Abbildung zeigt die Schmerzintensitäten (Balken) der schmerzbelasteten Pferde mit den jeweiligen ACTH 0-Werten (Punkte). Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Schmerzintensität und der Höhe des ACTH 0-Wertes festgestellt werden.

Es konnte kein Einfluss der Schmerzintensität auf die Höhe von ACTH 0 festgestellt werden. Der Regressionskoeffizient  $b$  gibt an, ob es zu einer Veränderung von ACTH 0 kommt, wenn die Schmerzintensität um eine Einheit (1 %) steigt. Der Regressionskoeffizient  $b$  lag bei  $-0,178$ , dies war jedoch nicht signifikant. Die Schmerzintensität war damit kein statistisch signifikanter Prädiktor für ACTH 0.

Das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  betrug  $0,083$ . Der Anteil der Variabilität von ACTH 0, der durch die Schmerzintensität erklärt werden konnte, lag somit nur bei etwa 8 %.

#### 4.6.4.2. ACTH 30

Auch ein möglicher Einfluss der Schmerzintensität auf die Höhe des ACTH-Wertes 30 Minuten nach TRH-Stimulation (ACTH 30) wurde mit einer linearen Regression geprüft. Die Abbildung 17 zeigt die Höhe der Schmerzintensitäten der Pferde mit Schmerzen und die jeweils dazugehörigen ACTH 30-Werte.



**Abb. 17:** Die Abbildung zeigt die Schmerzintensitäten (Balken) der schmerzbelasteten Pferde mit den jeweiligen ACTH 30-Werten (Punkte). Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Schmerzintensität und der Höhe des ACTH 30-Wertes festgestellt werden.

Es konnte ebenfalls kein Einfluss der Schmerzintensität auf die Höhe von ACTH 30 festgestellt werden. Der Regressionskoeffizient  $b$  lag bei  $-0,375$ , war aber nicht signifikant.

Auch hier war die Schmerzintensität kein statistisch signifikanter Prädiktor für die Höhe von ACTH 30.

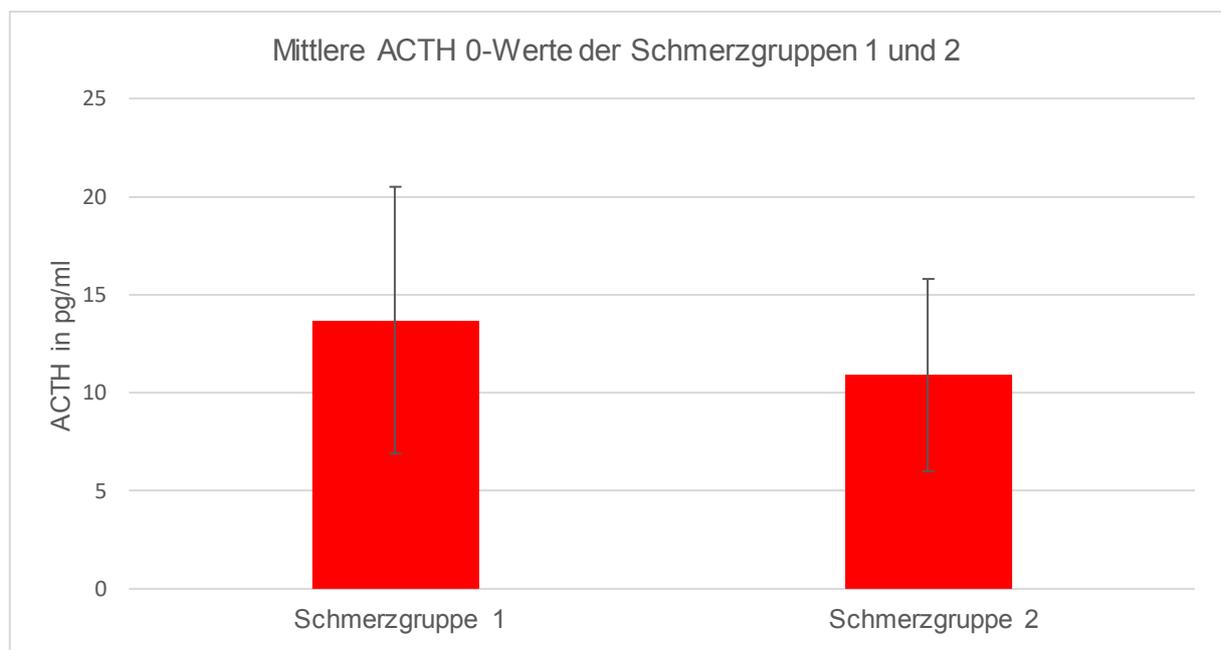
Das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  lag bei  $0,126$ , sodass nur etwa 12 % der Variabilität von ACTH 30 durch die Schmerzintensität erklärt werden konnten.

#### 4.6.5. Vergleich zwischen den verschiedenen Schmerzgruppen

Die gesamten untersuchten, an Schmerzen leidenden Pferde ( $n = 15$ ) wurden hinsichtlich ihrer Schmerzintensitäten in Untergruppen eingeteilt. Davon litten zehn an geringgradigen Schmerzen mit einer Schmerzintensität von 21 - 40 % und wurden als Schmerzgruppe 1 zusammengefasst. Bei fünf Pferden waren die Schmerzen mittelgradig mit einer Schmerzintensität von 41 - 60 %. Diese bildeten die Schmerzgruppe 2.

##### 4.6.5.1. ACTH 0

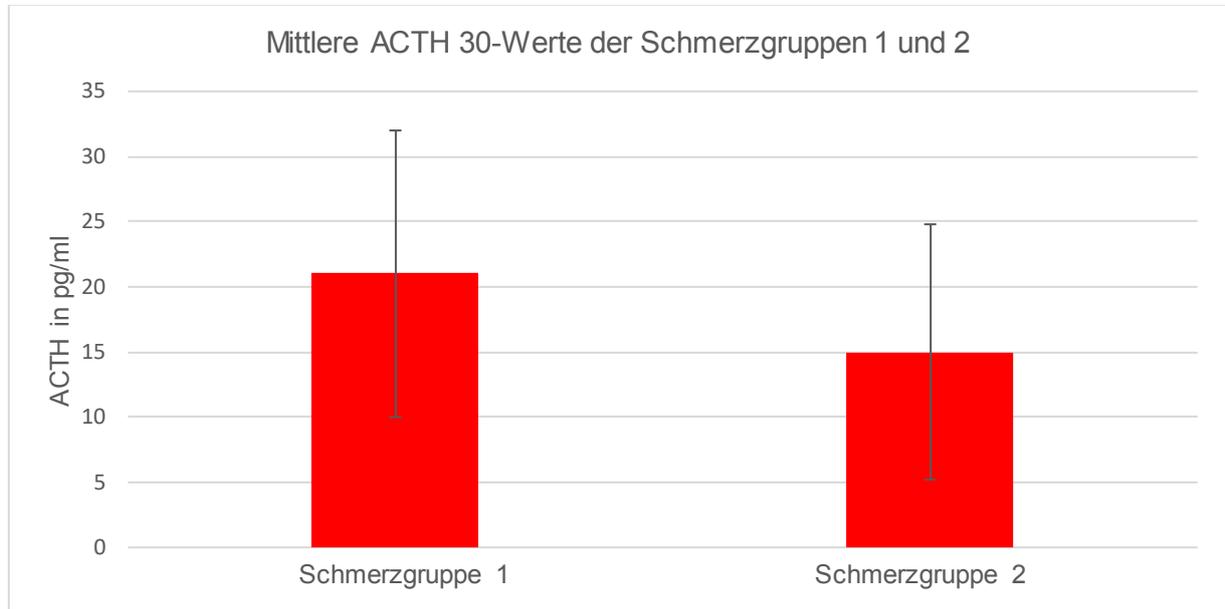
ACTH 0 war im Mittel in der Schmerzgruppe 1 ( $n = 10$ ; Mittelwert  $13,7 \pm 6,8$  pg/ml) höher als in der Schmerzgruppe 2 ( $n = 5$ ; Mittelwert  $10,9 \pm 4,9$  pg/ml). Dies war jedoch nicht signifikant (Abb. 18).



**Abb. 18:** Grafische Darstellung der mittleren ACTH 0-Werte der Pferde der Schmerzgruppe 1 ( $n = 10$ ) und Schmerzgruppe 2 ( $n = 5$ ). ACTH 0 war in der Schmerzgruppe 1 höher als in der Schmerzgruppe 2. Dies war jedoch statistisch nicht signifikant. Der Fehlerbalken entspricht  $\pm 1$  Standardabweichung.

#### 4.6.5.2. ACTH 30

ACTH 30 war im Mittel in der Schmerzgruppe 1 (n = 10; Mittelwert  $21 \pm 11$  pg/ml) höher als in der Schmerzgruppe 2 (n = 5; Mittelwert  $15 \pm 9,8$  pg/ml). Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (Abb. 19).



**Abb. 19:** Grafische Darstellung der mittleren ACTH 30-Werte der Pferde der Schmerzgruppe 1 (n = 10) und Schmerzgruppe 2 (n = 5). ACTH 30 war in der Schmerzgruppe 1 höher als in der Schmerzgruppe 2. Dies war jedoch statistisch nicht signifikant. Der Fehlerbalken entspricht  $\pm 1$  Standardabweichung.

#### 4.6.6. Vergleich zwischen den verschiedenen Krankheitsgruppen

Es wurde geprüft, ob es einen Unterschied bezüglich der ACTH-Werte bei verschiedenen Erkrankungen (Kolik, Hufrehe, andere orthopädische Erkrankung) gab. Dafür wurden alle Pferde mit Schmerzen (n = 15) berücksichtigt und hinsichtlich ihrer Diagnosen in verschiedene Krankheitsgruppen eingeteilt:

- Krankheitsgruppe 1 (Pferde mit Kolik, n = 2)
- Krankheitsgruppe 2 (Pferde mit Hufrehe, n = 4)
- Krankheitsgruppe 3 (Pferde mit einer orthopädischen Erkrankung, n = 9)

Da die Anzahl der Pferde in den einzelnen Gruppen sehr gering war, wurden die Daten innerhalb der Gruppen als nicht normalverteilt angesehen.

#### 4.6.6.1. ACTH 0

Der Median sowie Minimum und Maximum für ACTH 0 der Krankheitsgruppen 1, 2 und 3 sind in Tabelle 9 dargestellt.

**Tab. 9:** Median sowie Minimum- und Maximumwert von ACTH 0 in den verschiedenen Krankheitsgruppen.

ACTH 0 in pg/ml			
	Krankheitsgruppe 1 (Kolik, n = 2)	Krankheitsgruppe 2 (Hufrehe, n = 4)	Krankheitsgruppe 3 (Orthopädisch, n = 9)
Median	12,7	10,9	12
Minimum	6,8	5	6,5
Maximum	18,6	24,8	21,6

Es konnte kein signifikanter Unterschied der ACTH 0-Werte zwischen den verschiedenen Krankheitsgruppen festgestellt werden.

#### 4.6.6.2. ACTH 30

Der Median sowie Minimum und Maximum für ACTH 30 der Krankheitsgruppen 1, 2 und 3 sind in Tabelle 10 dargestellt.

**Tab. 10:** Median sowie Minimum- und Maximumwert von ACTH 30 in den verschiedenen Krankheitsgruppen.

ACTH 30 in pg/ml			
	Krankheitsgruppe 1 (Kolik, n = 2)	Krankheitsgruppe 2 (Hufrehe, n = 4)	Krankheitsgruppe 3 (Orthopädisch, n = 9)
Median	20,5	19,5	15,2
Minimum	18,3	2,5	8,6
Maximum	22,7	40,2	29,4

Die gemessenen ACTH 30-Werte wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Krankheitsgruppen auf.

## **4.7. Kortisol**

### **4.7.1. Kortisol-Basalwert (Kortisol 0)**

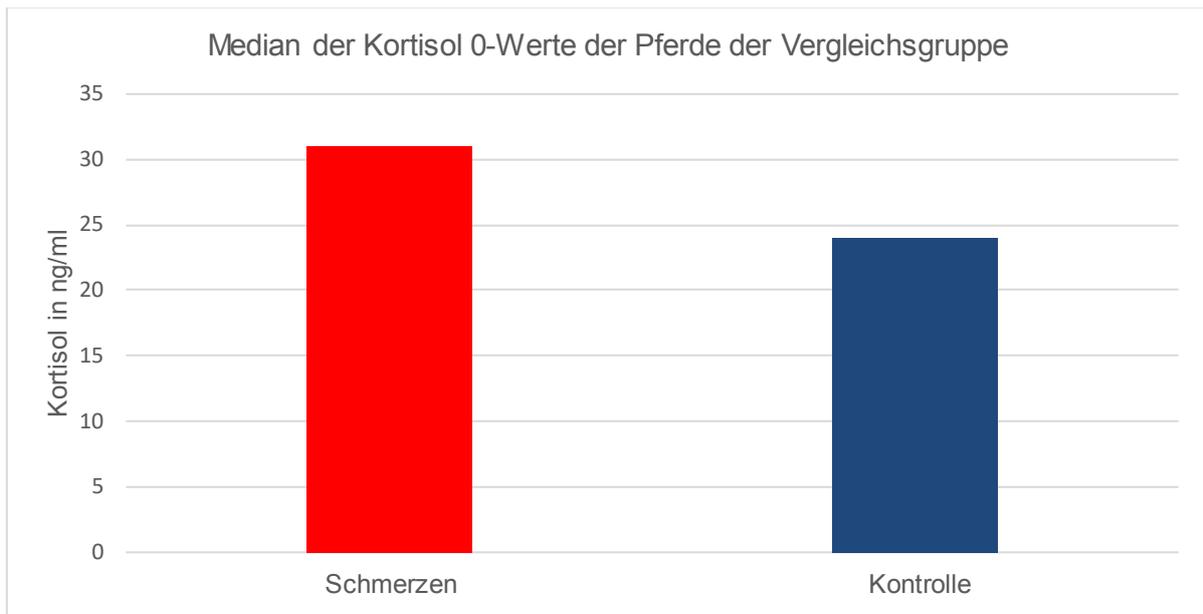
#### **4.7.1.1. Alle Pferde mit Schmerzen**

Von allen schmerzbelasteten Pferden (n = 15) lag der Median des Kortisol-Basalwertes (Kortisol 0) bei 30 ng/ml. Der kleinste gemessene Wert war 15,2 ng/ml, der größte gemessene Wert betrug 103 ng/ml.

Der Median lag damit an der unteren Grenze des vom Labor Synlab.vet in Berlin angegebenen Referenzbereiches für Kortisol von 30 - 130 ng/ml.

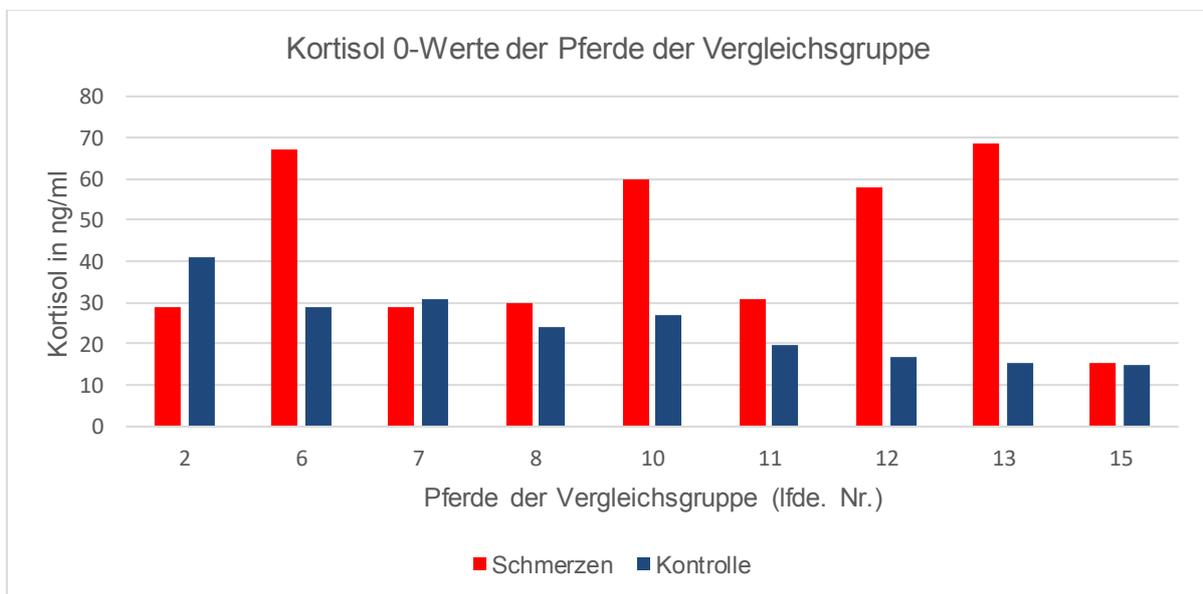
#### **4.7.1.2. Vergleichsgruppe**

Insgesamt ließ sich ein Anstieg von Kortisol 0 während des Schmerzzustandes feststellen. Dieser war jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 20). Der Median bei den Pferden mit Schmerzen betrug 31 ng/ml, mit einem Minimum von 15,2 ng/ml und einem Maximum von 68,5 ng/ml. Während der Kontrolluntersuchung lag der Median bei 24 ng/ml, der kleinste gemessene Wert betrug 15 ng/ml, der größte Wert lag bei 41 ng/ml.



**Abb. 20:** Grafische Darstellung der Mediane der Kortisol 0-Werte der Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9) mit Schmerzen und bei der Kontrolle. Das gemessene Kortisol 0 war während des Schmerzzustandes höher als bei der Kontrolluntersuchung. Dies war jedoch statistisch nicht signifikant.

Bei zwei Pferden der Vergleichsgruppe (Pferd Nr. 2, 7) wurde während des Schmerzzustandes ein niedrigerer Kortisol 0-Wert als bei der Kontrolluntersuchung gemessen (Abb. 21).

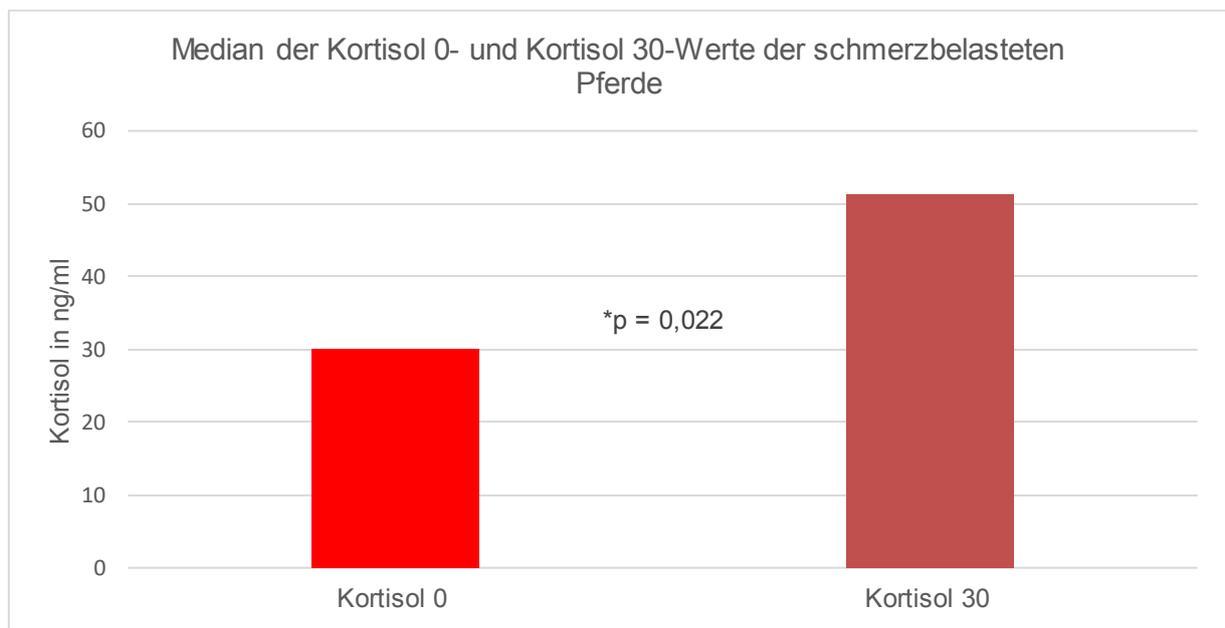


**Abb. 21:** Vergleich der Kortisol-Basalwerte (Kortisol 0) der einzelnen Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9) während des Schmerzzustandes und der Kontrolle. Bei zwei Tieren (Pferd Nr. 2, 7) wurde ein niedrigerer Kortisol 0-Wert während des Schmerzzustandes gemessen als bei der Kontrolluntersuchung. Die laufenden Nummern der Pferde sind als Nummerierung angegeben.

#### 4.7.2. TRH-Stimulationstest (Kortisol 30)

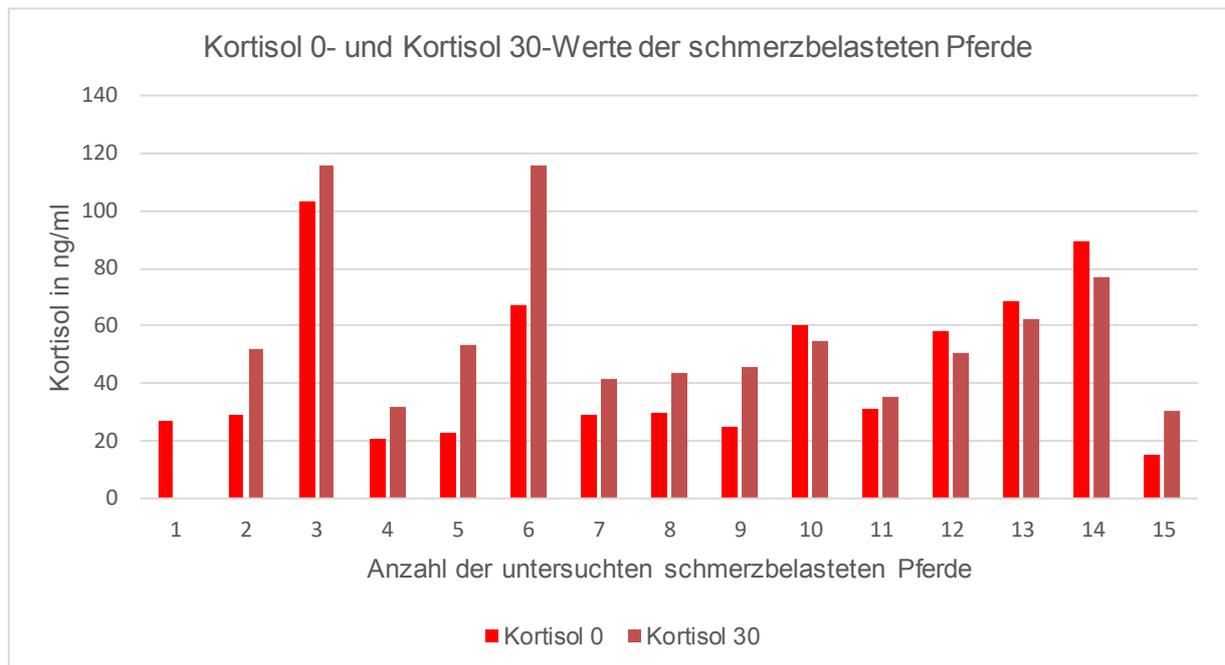
Es wurde zuerst geprüft, ob es 30 Minuten nach der Applikation von TRH zu einem Anstieg des Serum-Kortisols kam. Dieser Kortisolwert nach TRH-Stimulation wurde als Kortisol 30 bezeichnet. Bei einem Tier (Pferd Nr. 1) konnte kein Kortisolwert nach TRH-Stimulation gemessen werden.

Bei den untersuchten schmerzbelasteten Pferden ( $n = 15$ ) kam es 30 Minuten nach der Applikation von TRH insgesamt zu einem signifikanten Anstieg ( $p = 0,022$ ) von Kortisol 30 im Vergleich zu Kortisol 0 (Abb. 22). Der Median von Kortisol 30 betrug 51,3 ng/ml, mit einem Minimum von 30,2 ng/ml und einem Maximum von 116 ng/ml. Für Kortisol 0 betrug der Median 30 ng/ml, der kleinste gemessene Wert lag bei 15,2 ng/ml, der größte gemessene Wert lag bei 103 ng/ml.



**Abb. 22:** Die Abbildung zeigt die Mediane der Kortisol 0- und Kortisol 30-Werte der Pferde mit Schmerzen ( $n = 15$ ). Nach TRH-Applikation kam es zu einem signifikanten Anstieg von Kortisol 30 ( $p = 0,022$ ).

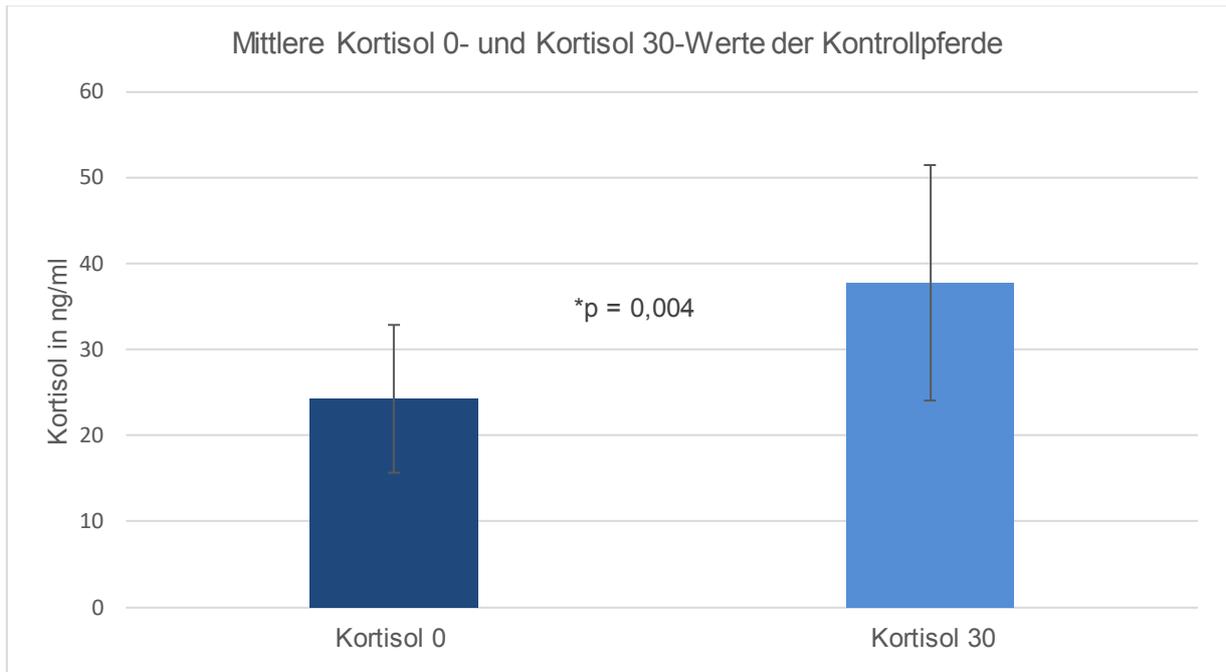
Bei vier Tieren (Pferd Nr. 10, 12, 13, 14) wurde nach TRH-Stimulation ein niedrigerer Kortisolwert gemessen im Vergleich zum Basalwert (Abb. 23).



**Abb. 23:** Kortisol-Basalwerte (Kortisol 0) und Kortisol nach TRH-Stimulation (Kortisol 30) der einzelnen schmerzbelasteten Pferde (n = 15). Von einem Tier (Pferd Nr. 1) konnte kein Kortisol 30-Wert gemessen werden. Bei vier Tieren (Pferd Nr. 10, 11, 13, 14) sank der Kortisolwert 30 Minuten nach der Applikation von TRH.

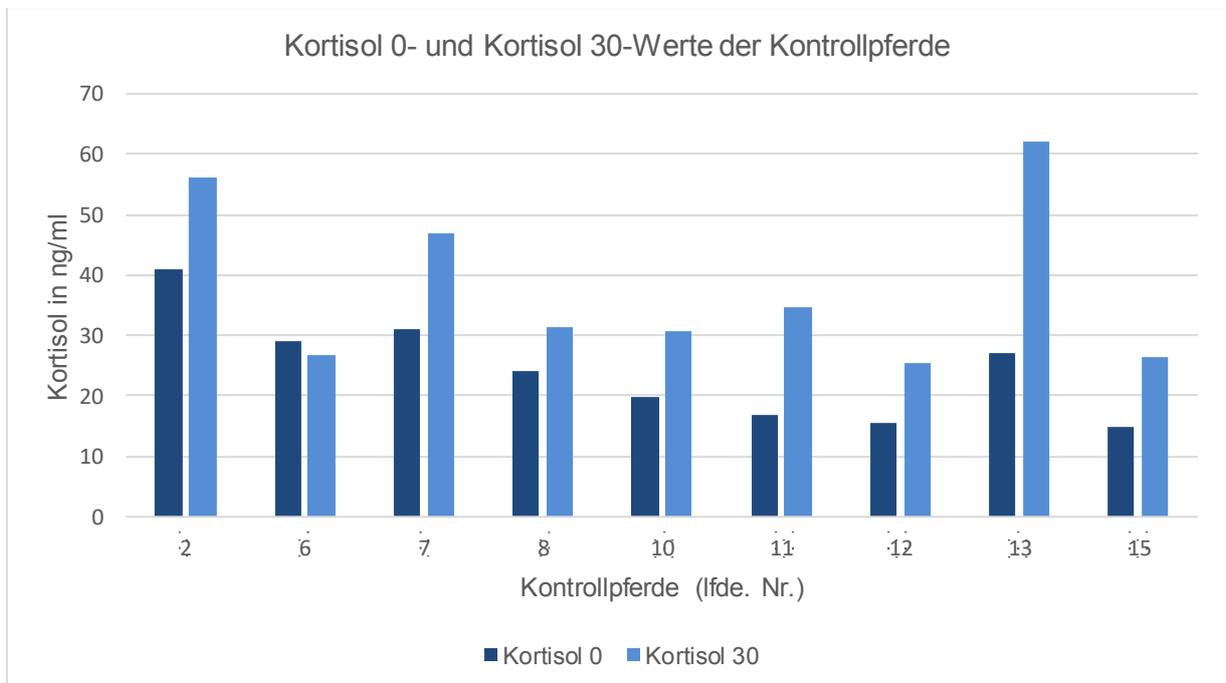
Bei der Kontrolluntersuchung waren die Kortisolwerte normalverteilt, sodass hier die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen dargestellt werden.

Bei den neun Pferden, bei denen eine Kontrolluntersuchung durchgeführt wurde, kam es ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg ( $p = 0,004$ ) des Kortisols, 30 Minuten nach TRH-Stimulation (Abb. 24). Der Mittelwert von Kortisol 30 betrug  $37,8 \pm 13,7$  ng/ml, der Mittelwert von Kortisol 0 lag bei  $24,3 \pm 8,6$  ng/ml.



**Abb. 24:** Grafische Darstellung der mittleren Kortisol 0- und Kortisol 30-Werte der Kontrollpferde (n = 9). Nach TRH-Applikation kam es zu einem signifikanten Anstieg von Kortisol 30 ( $p = 0,004$ ). Der Fehlerbalken entspricht  $\pm 1$  Standardabweichung.

Bei einem Tier (Pferd Nr. 6) sank das Kortisol nach TRH-Stimulation (Abb. 25).

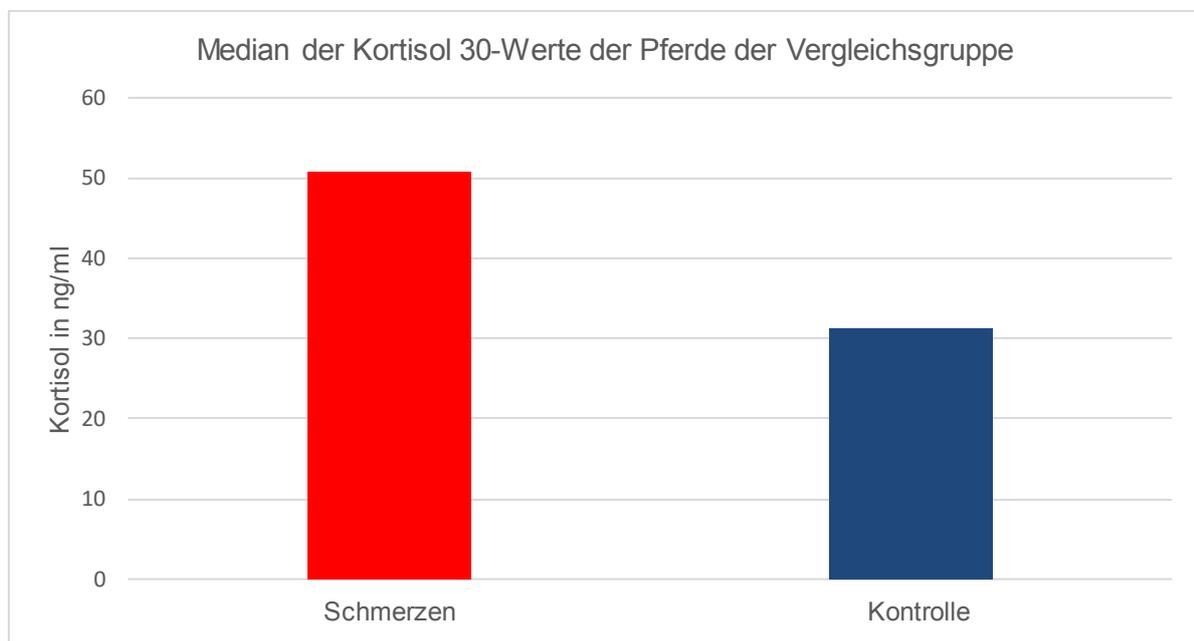


**Abb. 25:** Kortisol-Basalwerte (Kortisol 0) und Kortisol nach TRH-Stimulation (Kortisol 30) der einzelnen Kontrollpferde (n = 9). Bei einem Tier (Pferd Nr. 6) sank der Kortisolwert 30 Minuten nach der Applikation von TRH. Die laufenden Nummern der Pferde sind als Nummerierung angegeben.

#### 4.7.2.1. Vergleichsgruppe

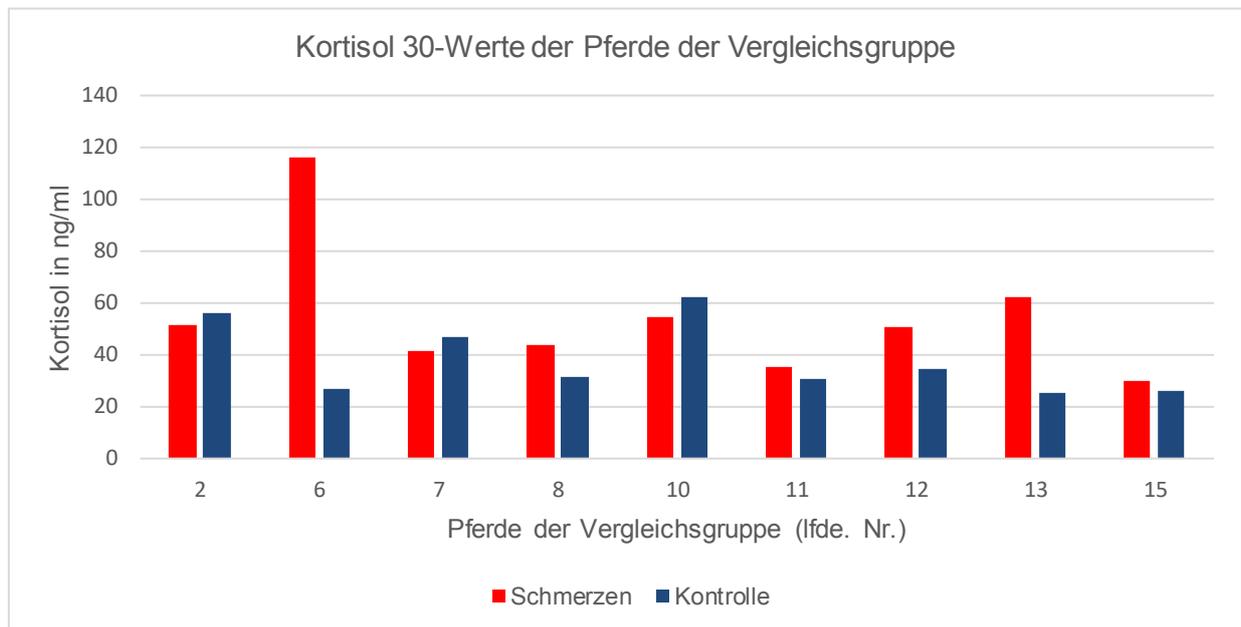
In der Vergleichsgruppe (n = 9) konnte während des Schmerzzustandes ein höherer Kortisol 30-Wert gemessen werden als bei der Kontrolluntersuchung. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 26).

Der Median von Kortisol 30 betrug während des Schmerzzustandes 50,8 ng/ml, mit einem Minimalwert von 30,2 ng/ml und einem Maximalwert von 116 ng/ml. Bei der Kontrolluntersuchung betrug der Median 31,3 ng/ml, mit einem Minimalwert von 25,6 ng/ml und einem Maximalwert von 62 ng/ml.



**Abb. 26:** Grafische Darstellung der Mediane der Kortisol 30-Werte der Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9) mit Schmerzen und bei der Kontrolle. Das gemessene Kortisol 30 war während des Schmerzzustandes höher als bei der Kontrolluntersuchung. Dies war jedoch statistisch nicht signifikant.

Bei drei Tieren (Pferd Nr. 2, 7, 10) konnte während des Schmerzzustandes ein geringerer Kortisol 30-Wert gemessen werden als bei der Kontrolluntersuchung (Abb. 27).

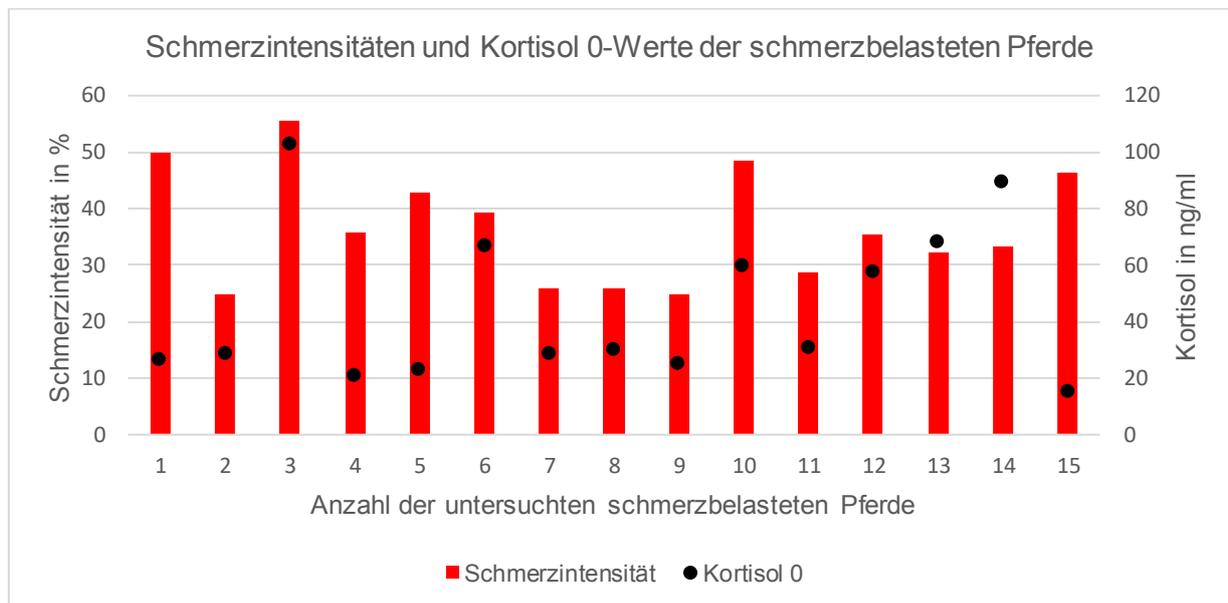


**Abb. 27:** Vergleich der Kortisolwerte nach TRH-Stimulation (Kortisol 30) der einzelnen Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9) während des Schmerzzustandes und der Kontrolle. Bei drei Tieren (Pferd Nr. 2, 7, 10) wurde ein niedrigerer Kortisol 30-Wert während des Schmerzzustandes gemessen als bei der Kontrolluntersuchung. Die laufenden Nummern der Pferde sind als Nummerierung angegeben.

### 4.7.3. Einfluss der Schmerzintensität auf Kortisol

#### 4.7.3.1. Kortisol 0

Ob es einen Zusammenhang zwischen der Höhe der Schmerzintensität und dem Kortisol-Basalwert (Kortisol 0) gab, wurde mit einer linearen Regression geprüft. Dafür wurden alle untersuchten an Schmerzen leidenden Pferde ( $n = 15$ ) in die Berechnungen mit einbezogen. Die Abbildung 28 zeigt die Höhe der Schmerzintensitäten der schmerzbelasteten Pferde und die jeweils dazugehörigen Kortisol 0-Werte.



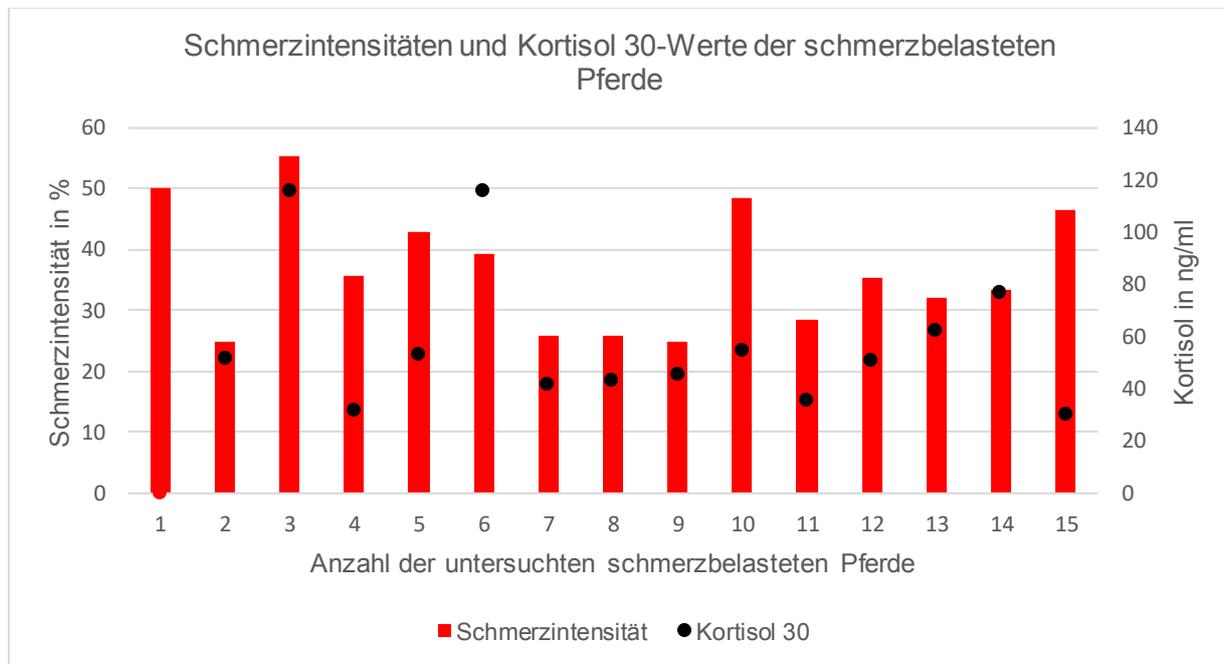
**Abb. 28:** Die Abbildung zeigt die Schmerzintensitäten (Balken) der schmerzbelasteten Pferde mit den jeweiligen Kortisol 0-Werten (Punkte). Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Schmerzintensität und der Höhe des Kortisol 0-Wertes festgestellt werden.

Es konnte kein Einfluss der Schmerzintensität auf die Höhe von Kortisol 0 festgestellt werden. Der Regressionskoeffizient  $b$  betrug 0,904, dies war jedoch nicht signifikant. Die Schmerzintensität war also kein statistisch signifikanter Prädiktor für Kortisol 0.

Das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  betrug 0,111. Das heißt, dass etwa 11 % der Variabilität von Kortisol 0 durch die Schmerzintensität erklärt werden konnten.

#### 4.7.3.2. Kortisol 30

Auch ein möglicher Einfluss der Schmerzintensität auf die Höhe des Kortisolwertes 30 Minuten nach TRH-Stimulation (Kortisol 30) wurde mit einer linearen Regression geprüft (Abb. 29). Für Pferd Nr. 1 konnte kein Kortisol 30-Wert gemessen werden.



**Abb. 29:** Die Abbildung zeigt die Schmerzintensitäten (Balken) der schmerzbelasteten Pferde mit den jeweiligen Kortisol 30-Werten (Punkte). Für Pferd Nr. 1 wurde kein Kortisol 30-Wert gemessen. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Schmerzintensität und der Höhe des Kortisol 30-Wertes festgestellt werden.

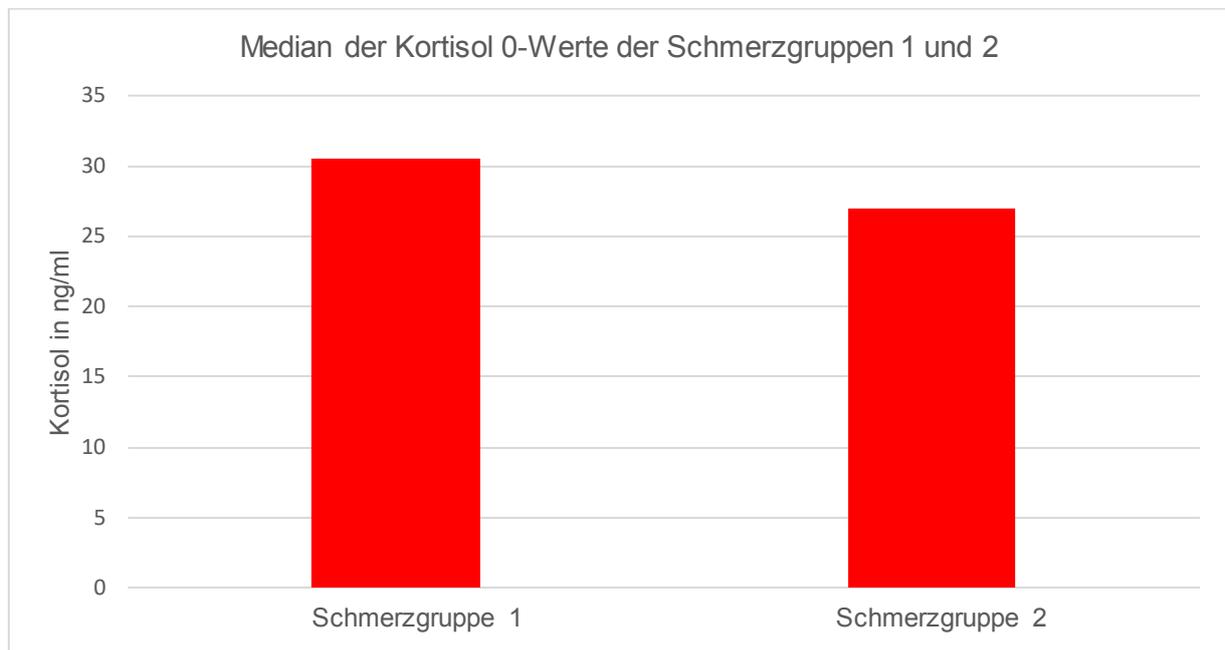
Es konnte auch hier kein Einfluss der Schmerzintensität auf die Höhe von Kortisol 30 festgestellt werden. Der Regressionskoeffizient  $b$  betrug 1,253, war aber nicht signifikant. Die Schmerzintensität war damit kein statistisch signifikanter Prädiktor für Kortisol 30.

Das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  lag bei 0,210. Etwa 21 % der Variabilität von Kortisol 30 konnten also durch die Schmerzintensität erklärt werden.

#### 4.7.4. Vergleich zwischen den verschiedenen Schmerzgruppen

##### 4.7.4.1. Kortisol 0

In der Schmerzgruppe 1 war das gemessene Kortisol 0 höher als in Schmerzgruppe 2 (Abb. 30). Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. In der Schmerzgruppe 1 (n = 10) betrug der Median des Kortisol 0-Wertes 30,5 ng/ml, mit einem Minimalwert von 21 ng/ml und einem Maximalwert von 89,5 ng/ml. In der Schmerzgruppe 2 (n = 5) lag der Median bei 27 ng/ml, mit einem Minimalwert von 15,2 ng/ml und einem Maximalwert von 103 ng/ml.



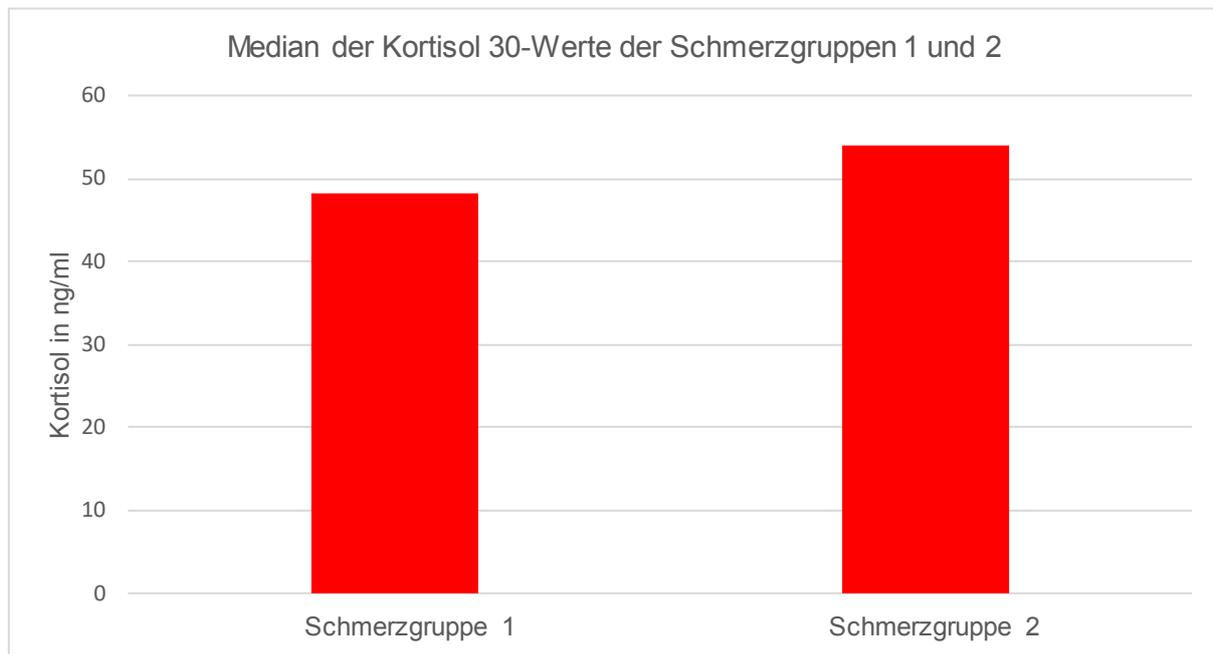
**Abb. 30:** Grafische Darstellung der Mediane der Kortisol 0-Werte der Pferde der Schmerzgruppe 1 (n = 10) und Schmerzgruppe 2 (n = 5). Kortisol 0 war in der Schmerzgruppe 1 höher als in der Schmerzgruppe 2. Dies war jedoch statistisch nicht signifikant.

##### 4.7.4.2. Kortisol 30

Von einem Pferd (Pferd Nr. 1) konnte kein Kortisol 30-Wert gemessen werden. Dieses Pferd war in der Schmerzgruppe 2.

Kortisol 30 lag in der Schmerzgruppe 2 höher als in der Schmerzgruppe 1 (Abb. 31). Dies war jedoch nicht signifikant. In der Schmerzgruppe 1 (n = 10) betrug der Median 48,2 ng/ml, mit einem Minimalwert von 31,9 ng/ml und einem Maximalwert von 116 ng/ml. In der Schmerzgruppe 2 (n = 4) berechnete sich ein Median von 53,9 ng/ml, mit einem Minimalwert

von 30,2 ng/ml und einem Maximalwert von 116 ng/ml.



**Abb. 31:** Grafische Darstellung der Mediane der Kortisol 30-Werte der Pferde der Schmerzgruppe 1 (n = 10) und Schmerzgruppe 2 (n = 4). Von einem Pferd aus der Schmerzgruppe 2 konnte kein Kortisol 30 gemessen werden. Insgesamt war Kortisol 30 in der Schmerzgruppe 2 höher als in der Schmerzgruppe 1. Dies war jedoch statistisch nicht signifikant.

#### 4.7.5. Vergleich zwischen den verschiedenen Krankheitsgruppen

##### 4.7.5.1. Kortisol 0

Der Median sowie Minimum und Maximum für Kortisol 0 der Krankheitsgruppen 1, 2 und 3 sind in Tabelle 11 dargestellt.

**Tab. 11:** Median sowie Minimum- und Maximumwert von Kortisol 0 in den verschiedenen Krankheitsgruppen.

Kortisol 0 in ng/ml			
	Krankheitsgruppe 1 (Kolik, n = 2)	Krankheitsgruppe 2 (Hufrehe, n = 4)	Krankheitsgruppe 3 (Orthopädisch, n = 9)
Median	96,3	44	27
Minimum	89,5	29	15,2
Maximum	103	60	68,5

Die höchsten Kortisol-Basalwerte wurden in der Krankheitsgruppe 1, also bei den Pferden mit Kolik, gemessen. Danach folgten die Pferde mit Hufrehe aus der Krankheitsgruppe 2, die niedrigsten Werte hatten die Pferde mit einer orthopädischen Erkrankung in Krankheitsgruppe 3. Trotzdem gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Der p-Wert betrug dabei 0,052. Er lag also knapp über dem festgelegten Signifikanzniveau von 0,05.

#### 4.7.5.2. Kortisol 30

Auch für den Kortisolwert nach TRH-Stimulation (Kortisol 30) wurde bei allen an Schmerzen leidenden Pferden (n = 15) untersucht, ob es einen Unterschied zwischen den verschiedenen Krankheitsgruppen gab. Der Median sowie Minimum und Maximum für Kortisol 30 der Krankheitsgruppen 1, 2 und 3 sind in Tabelle 12 dargestellt.

**Tab. 12:** Median sowie Minimum- und Maximumwert von Kortisol 30 in den verschiedenen Krankheitsgruppen.

Kortisol 30 in ng/ml			
	Krankheitsgruppe 1 (Kolik, n = 2)	Krankheitsgruppe 2 (Hufrehe, n = 4)	Krankheitsgruppe 3 (Orthopädisch, n = 9)
Median	96,5	47,2	48,6
Minimum	77	41,3	30,2
Maximum	116	54,4	116

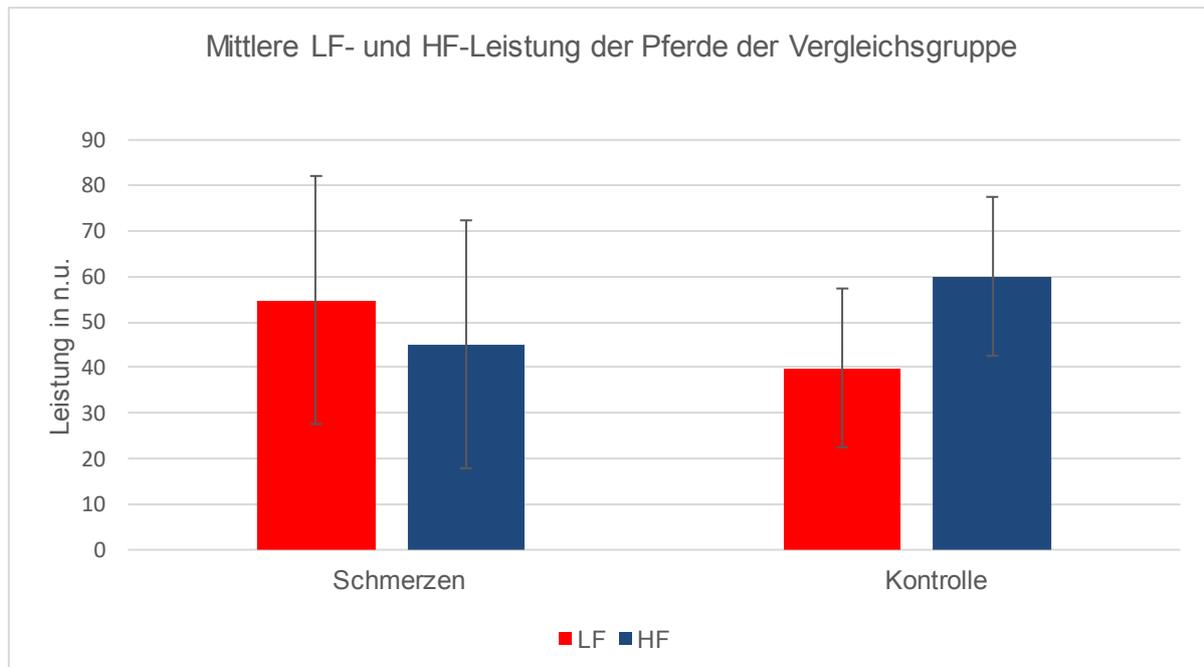
Für das Kortisol nach TRH-Stimulation wurden die höchsten Werte ebenfalls in der Gruppe der Koliker gemessen. Auch hier gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Krankheitsgruppen.

## 4.8. Herzfrequenzvariabilität

### 4.8.1. LF-Leistung, HF-Leistung und LF/HF-Ratio

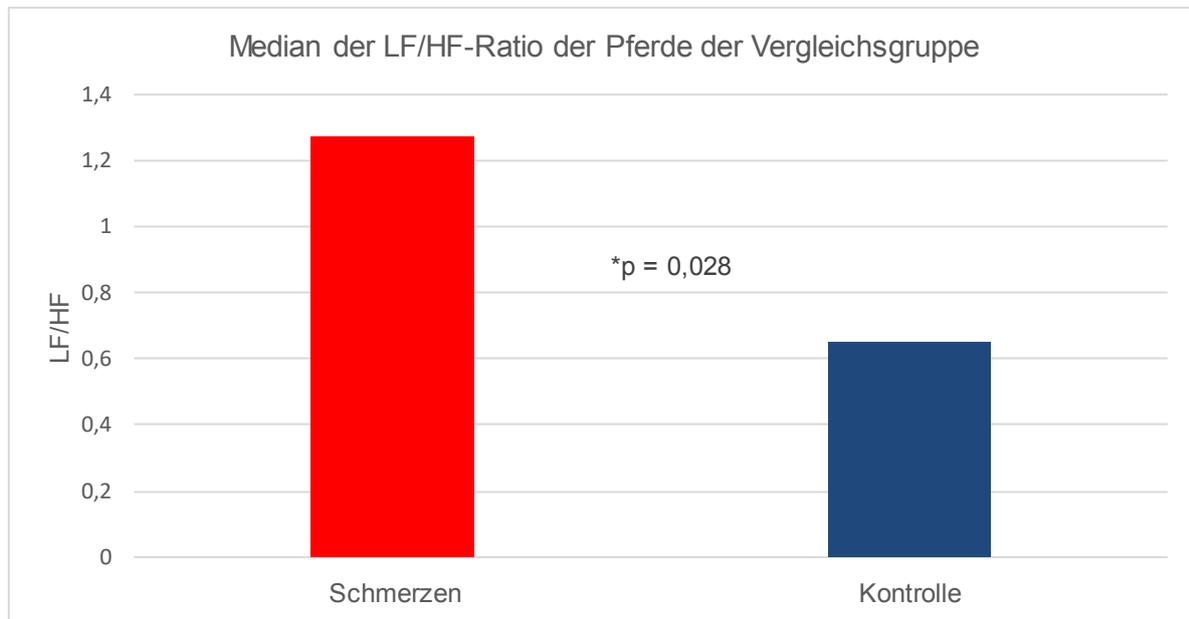
#### 4.8.1.1. Vergleichsgruppe

Die LF-Komponente lag während des Schmerzzustandes (Mittelwert  $54,87 \pm 27,23$  n.u.) höher als bei der Kontrolluntersuchung (Mittelwert  $39,94 \pm 17,45$  n.u.). Gleichzeitig sank der HF-Bereich bei den Pferden mit Schmerzen (Mittelwert  $45,13 \pm 27,23$  n.u.) im Vergleich zu der Kontrolle (Mittelwert  $60,06 \pm 17,45$  n.u.). Der Anstieg der LF- und der Abfall der HF-Komponente während des Schmerzzustandes waren jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 32).



**Abb. 32:** Mittlere LF- und HF-Leistung der Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9) mit Schmerzen und bei der Kontrolle. Während des Schmerzzustandes kam es zu einem Anstieg der LF- und einem Abfall der HF-Komponente. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Der Fehlerbalken entspricht  $\pm 1$  Standardabweichung.

Die LF/HF-Ratio war nicht normalverteilt, weswegen hier der Median angegeben wurde. Sie lag entsprechend bei den Pferden mit Schmerzen höher (Median 1,27, Minimum 0,22, Maximum 11,49) im Vergleich zur Kontrolle (Median 0,65, Minimum 0,21, Maximum 2,68). Hier konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Schmerzen und Kontrolle festgestellt werden ( $p = 0,028$ ) (Abb. 33).



**Abb. 33:** Grafische Darstellung der Mediane der LF/HF-Ratio bei den Pferden der Vergleichsgruppe ( $n = 9$ ) mit Schmerzen und bei der Kontrolle. Die LF/HF-Ratio war während des Schmerzzustandes signifikant höher als bei der Kontrolluntersuchung ( $p = 0,028$ ).

## **4.8.2. Einfluss der Schmerzintensität auf die Parameter der HFV**

### **4.8.2.1. LF- und HF-Leistung**

Um zu prüfen, ob die LF- und HF-Komponente mit der Schmerzintensität korrelierten, wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Dafür wurden alle schmerzbelasteten Pferde ( $n = 15$ ) in die Berechnungen mit einbezogen. Es bestand keine Korrelation zwischen der Schmerzintensität und den frequenzbezogenen Parametern der Herzfrequenzvariabilität. Der Korrelationskoeffizient betrug für die LF-Komponente  $-0,227$  und für die HF-Komponente entsprechend  $0,227$ , diese waren jedoch nicht signifikant.

Auch mittels der linearen Regression konnte kein Einfluss der Schmerzintensität auf die Höhe der LF- und HF-Komponente festgestellt werden. Der Regressionskoeffizient  $b$  lag für die LF-Komponente bei  $-0,624$ , für HF bei  $0,624$ . Dies war jedoch ebenfalls nicht signifikant. Die Schmerzintensität war damit kein statistisch signifikanter Prädiktor für die frequenzbezogenen Parameter der Herzfrequenzvariabilität

Das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  betrug für die LF- und HF-Komponente  $0,052$ . Der Anteil der Variabilität der frequenzbezogenen Parameter, der durch die Schmerzintensität erklärt werden konnte, lag somit bei etwa  $5\%$ .

### **4.8.2.2. LF/HF-Ratio**

Die Werte der LF/HF-Ratio waren nicht normalverteilt, sodass der Spearman-Rank Korrelationskoeffizient berechnet wurde. Es konnte keine Korrelation zwischen der Schmerzintensität und der LF/HF-Ratio festgestellt werden. Der Korrelationskoeffizient betrug  $-0,166$ , war aber nicht signifikant.

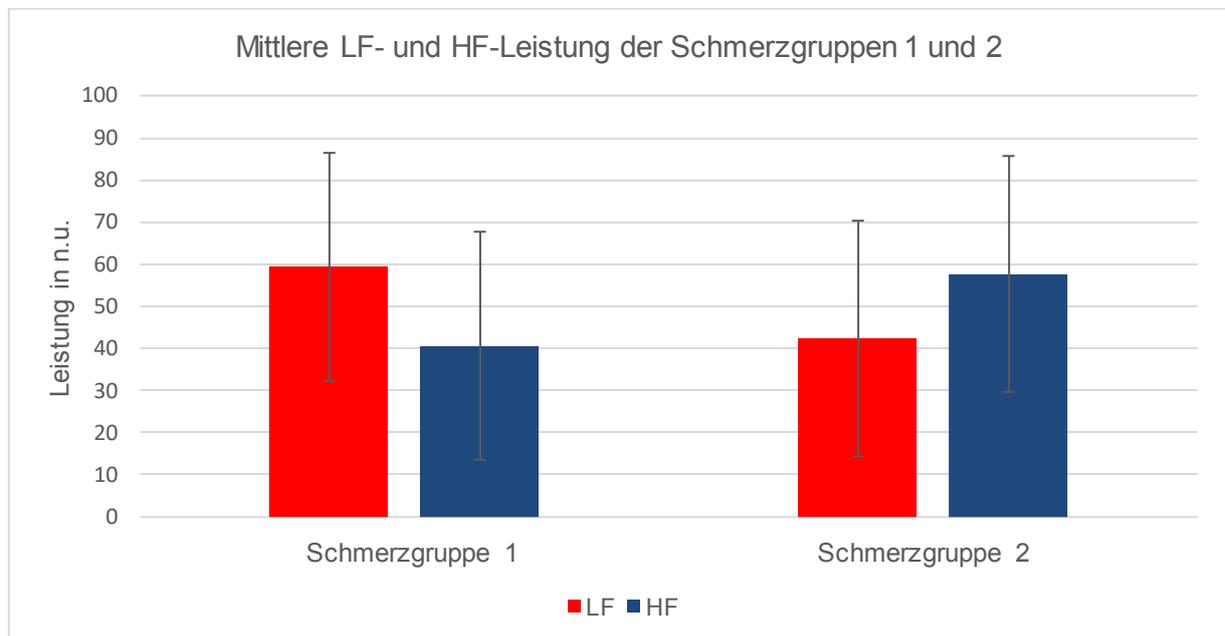
Auch die lineare Regression ergab, dass die Höhe der Schmerzintensität keinen Einfluss auf die LF/HF-Ratio hat. Der Regressionskoeffizient  $b$  betrug  $-0,092$ , war aber nicht signifikant. Die Schmerzintensität war somit kein signifikanter Prädiktor für die Werte der LF/HF-Ratio.

Das Bestimmtheitsmaß  $r^2$  lag bei  $0,084$ . Etwa  $8\%$  der Variabilität der Werte der LF/HF-Ratio konnten durch die Schmerzintensität erklärt werden.

### 4.8.3. Vergleich zwischen den verschiedenen Schmerzgruppen

#### 4.8.3.1. LF- und HF-Leistung

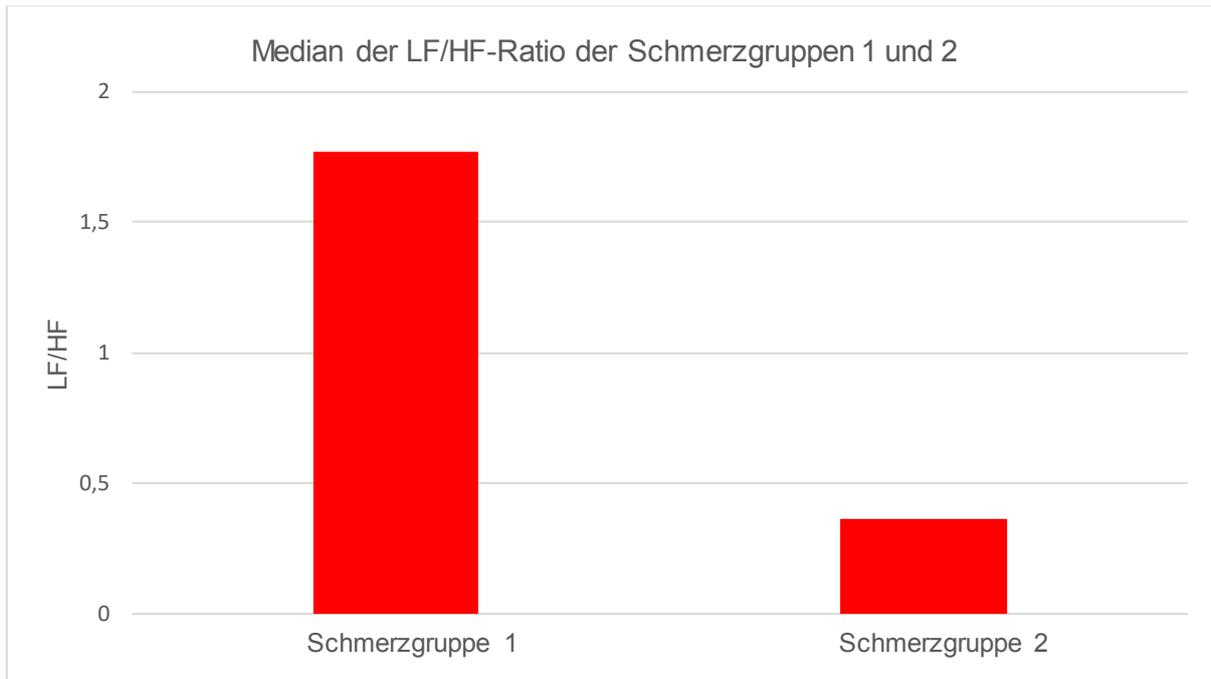
Die LF-Leistung lag im Mittel in der Schmerzgruppe 1 ( $n = 10$ ; Mittelwert  $59,36 \pm 27,05$  n.u.) höher als in der Schmerzgruppe 2 ( $n = 5$ ; Mittelwert  $42,32 \pm 27,99$  n.u.). Entsprechend waren die Werte der HF-Leistung im Mittel in der Schmerzgruppe 1 ( $n = 10$ ; Mittelwert  $40,64 \pm 27,05$  n.u.) niedriger als in Schmerzgruppe 2 ( $n = 5$ ; Mittelwert  $57,68 \pm 27,99$  n.u.). Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Abb. 34).



**Abb. 34:** Grafische Darstellung der mittleren LF- und HF-Leistungen der Pferde der Schmerzgruppe 1 ( $n = 10$ ) und Schmerzgruppe 2 ( $n = 5$ ). In der Schmerzgruppe 1 war die LF-Komponente höher und die HF-Komponente niedriger als in Schmerzgruppe 2. Dies war jedoch statistisch nicht signifikant.

#### 4.8.3.2. LF/HF-Ratio

Die LF/HF-Ratio war in der Schmerzgruppe 1 ( $n = 10$ ) höher als in Schmerzgruppe 2 ( $n = 5$ ). Dies war jedoch nicht signifikant (Abb. 35). In der Schmerzgruppe 1 betrug der Median 1,77, mit einem Minimum von 0,22 und einem Maximum von 11,49. In der Schmerzgruppe 2 lag der Median bei 0,36, der kleinste gemessene Wert betrug 0,23, der größte gemessene Wert 5,78.



**Abb. 35:** Grafische Darstellung der Mediane der LF/HF-Ratio der Pferde der Schmerzgruppe 1 (n = 10) und Schmerzgruppe 2 (n = 5). Die LF/HF-Ratio war in der Schmerzgruppe 1 höher als in der Schmerzgruppe 2. Dies war jedoch statistisch nicht signifikant.

#### 4.8.4. Vergleich zwischen den verschiedenen Krankheitsgruppen

##### 4.8.4.1. LF- und HF-Leistung

Tabelle 13 zeigt den Median sowie den Minimum- und Maximumwert der LF-Leistung in den Krankheitsgruppe 1, 2 und 3.

**Tab. 13:** Median sowie Minimum- und Maximumwert der LF-Leistung in den verschiedenen Krankheitsgruppen.

LF-Leistung in n.u.			
	Krankheitsgruppe 1 (Kolik, n = 2)	Krankheitsgruppe 2 (Hufrehe, n = 4)	Krankheitsgruppe 3 (Orthopädisch, n = 9)
Median	42,55	55,25	60,70
Minimum	18,60	18,30	23,30
Maximum	66,50	81,00	92,0

Die LF-Leistung war in der Krankheitsgruppe 3 am höchsten. Trotzdem waren die Unterschiede in der Verteilung zwischen den Gruppen nicht signifikant.

Die HF-Leistung wies in der Krankheitsgruppe 3 die geringsten Werte auf (Tab. 14). Aber auch hier waren die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant.

**Tab. 14:** Median sowie Minimum- und Maximumwert der HF-Leistung in den verschiedenen Krankheitsgruppen.

HF-Leistung in n.u.			
	Krankheitsgruppe 1 (Kolik, n = 2)	Krankheitsgruppe 2 (Hufrehe, n = 4)	Krankheitsgruppe 3 (Orthopädisch, n = 9)
Median	57,45	44,75	39,30
Minimum	33,50	19,0	8,0
Maximum	81,40	81,70	76,70

#### 4.8.4.2. LH/HF-Ratio

Der Median sowie der Minimum- und Maximumwert der LF/HF-Ratio sind in Tabelle 15 dargestellt.

**Tab. 15:** Median sowie Minimum- und Maximumwert der LF/HF-Ratio in den verschiedenen Krankheitsgruppen.

LF/HF-Ratio			
	Krankheitsgruppe 1 (Kolik, n = 2)	Krankheitsgruppe 2 (Hufrehe, n = 4)	Krankheitsgruppe 3 (Orthopädisch, n= 9)
Median	1,11	1,24	1,55
Minimum	0,23	0,22	0,30
Maximum	1,99	4,25	11,49

Auch für die LF/HF-Ratio konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

## 5. Diskussion

### 5.1. Diskussion von Material und Methoden

#### 5.1.1. Auswahl der Pferde

In der vorliegenden Arbeit wurden die ACTH- und Kortisolwerte von 17 Pferden mit Schmerzen gemessen. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch eine Pituitary Pars Intermedia Dysfunction auszuschließen, durften die Tiere nicht älter als 15 Jahre alt sein und keine klinischen Anzeichen auf eine PPID aufweisen. Diese wurden definiert als Hypertrichose, Hyperhidrosis, eine abnormale Fettumverteilung sowie das Vorhandensein eines Senkrückens und Pendelabdomens. Diese Symptome sind klassisch für eine PPID und wurden in vielen Studien zur klinischen Unterscheidung von erkrankten und gesunden Pferden verwendet (BEECH et al. 2007, MCFARLANE 2011, BEECH et al. 2011b). Doch auch Pferde ohne klinische Symptome können eine Hyperplasie der Pars intermedia der Hypophyse aufweisen und somit an einer subklinischen PPID leiden (FRANK et al. 2006a). Solche klinisch unauffälligen Tiere haben oft ACTH-Basalwerte im Referenzbereich, können aber einen positiven TRH-Stimulationstest aufweisen (BEECH et al. 2007). Da in der vorliegenden Studie von den ausgewählten Pferden vorab kein TRH-Stimulationstest gemacht wurden, konnte also nicht mit 100%iger Sicherheit ausgeschlossen werden, dass keines der Pferde an einer subklinischen PPID litt.

Um die Wahrscheinlichkeit einer subklinischen PPID weiter zu verringern, wurden nur Pferde  $\leq 15$  Jahren untersucht, denn die Erkrankung tritt vorwiegend bei älteren Tieren auf (MCFARLANE 2011). MILLER et al (2008) untersuchten die Hypophysen von 33 Pferden verschiedener Altersstufen. Die Pferde mit normaler Hypophyse waren  $< 12$  Jahre alt. Die meisten Pferde mit einem Alter  $> 20$  Jahren wiesen dagegen Veränderungen der Hypophyse im Sinne einer Hyperplasie oder eines Adenoms auf. Das Alter der Tiere korrelierte dabei stark mit den histologischen Veränderungen. Trotzdem gibt es einige Fälle, bei denen die erkrankten Pferde jünger als 15 Jahre alt waren (ORTH et al. 1982a, HEINRICHS et al. 1990, FRANK et al. 2006a), sodass dieses in der vorliegenden Arbeit gewählte Grenzalter ebenfalls nicht garantieren konnte, dass alle untersuchten Pferde gesund waren.

Die an Schmerzen leidenden Pferde wurden in drei Krankheitsgruppen eingeteilt: Pferde mit Kolik, Pferde mit Hufrehe und Pferde mit einer orthopädischen Erkrankung. Die Hufrehe stellt jedoch ein bedeutendes Symptom der PPID dar (SCHOTT 2002). DONALDSON et al. (2004)

untersuchten 40 Pferden mit Hufrehe und fanden bei 70 % erhöhte ACTH-Werte, die auf eine PPID-Erkrankung hindeuteten. Trotzdem wurden Pferde mit diesem Symptom in die vorliegende Studie integriert. Die Hufrehe ist eine schmerzhafte Erkrankung des Hufbeinträgers und stellt ein gutes Schmerzmodell dar. RIETMANN et al. (2004a) verwendeten ebenfalls Pferde mit Hufrehe zur Evaluierung der Kortisolsekretion bei Schmerzen. Außerdem war es wichtig, auch Pferde mit genau dieser Art von Schmerz zu untersuchen, da eine der Kernfragen der vorliegenden Studie lautet, ob Pferde mit Hufrehe auf PPID getestet werden können.

Da zwei der 17 untersuchten Pferde aus den Berechnungen ausgeschlossen werden mussten, wurden nur 15 Pferde in die Studie integriert. Die Stichprobenanzahl und die Power der Studie waren damit sehr gering. Ein Grund für die geringe Patientenzahl könnte die Altersbeschränkung der Pferde gewesen sein. Außerdem wurden nur Pferde untersucht, die wegen einer schmerzhaften Grunderkrankung in der Pferdeklinik vorgestellt wurden. Es wurde kein zusätzlicher Schmerzstimulus zugefügt. Im Zuge der Behandlung der Grunderkrankung wurden die Pferde mit Analgetika versorgt. Dadurch konnten nur solche Tiere in die Studie aufgenommen werden, die trotz Schmerztherapie noch ein erkennbares und messbares Maß an Schmerzen aufwiesen.

### **5.1.2. Mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch Medikamente**

Alle schmerzbelasteten Pferde bekamen am Tag der Probenentnahme Medikamente. Da jedes Pferd aufgrund einer schmerzhafte Erkrankung in der Klinik vorgestellt wurde, wurden alle mit Analgetika versorgt. Eingesetzt wurden unter anderem die nicht-steroidalen Antiphlogistika (non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID) Flunixin, Phenylbutazon und Metamizol.

Die Halbwertszeit von Flunixin im Blut für die Elimination beträgt beim Pferd nur ca. 1,6 Stunden. Aufgrund der weiten Verteilung des Medikaments im Körper können die Wirkungen aber viel länger anhalten (CHAY et al. 1982). Die Angaben zur Länge der analgetischen Effekte unterscheiden sich. So werden für Kolikschmerzen 6 - 8 Stunden (KOHN and MUIR 1988), für akute orthopädische Schmerzen 12 Stunden (FOREMAN and RUEMMLER 2011) oder sogar eine Wirkungsdauer von 24 Stunden angegeben (CHAY et al. 1982). Phenylbutazon besitzt eine längere Plasma-Halbwertszeit von 3 - 10 Stunden (TOBIN et al. 1986). Seine Wirkungsdauer ist dosisabhängig mit ca. 8 - 12 Stunden angegeben, kann aber auch länger anhalten (RAEKALLIO et al. 1997a, FOREMAN et al. 2008, FOREMAN and

RUEMMLER 2011). Metamizol wird beim Pferd vor allem für die Behandlung viszeraler Schmerzen eingesetzt, wirkt nach 8 - 10 Minuten analgetisch und hat eine Wirkungsdauer von ca. 50 Minuten (ROELVINK et al. 1991). Die NSAIDs wurden in der vorliegenden Studie am Morgen desselben Tages der Probenentnahme gegeben. Bei einem der Koliker erfolgte die Applikation von Metamizol wegen der starken Schmerzsymptomatik sogar nur eine Stunde vor der Untersuchung. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die Pferde zum Zeitpunkt der Messungen noch wirkungsvolle Plasmaspiegel aufwiesen.

MORRIS und GARCIA (1985) untersuchten den Einfluss von Phenylbutazon auf die Nebenniere von gesunden Pferden. Es kam dabei zu keinen signifikanten Veränderungen der Kortisolkonzentrationen unter Phenylbutazontherapie. Auch in anderen Studien an Pferden mit Schmerzen konnte kein Einfluss dieses NSAIDs auf die Serum-Kortisolkonzentrationen festgestellt werden (RAEKALLIO et al. 1997a, RIETMANN et al. 2004a, FOREMAN et al. 2008). COLAHAN et al. (2002) konnten bei gesunden Pferden ebenfalls keine Veränderungen der ACTH- oder Kortisolkonzentrationen nach der Applikation von Flunixin feststellen. Während der Enthornung von Kälbern führte Flunixin aber zu einem Absinken von Kortisol im Vergleich zu Tieren ohne Schmerzmedikation (HUBER et al. 2013). RIETMANN et al. (2004a) fanden bei schmerzbelasteten Pferden mit Hufrehe hingegen keine signifikante Reduktion des Kortisolwertes nach der Gabe des NSAIDs Vedaprofen, obwohl sich das klinische Bild verbesserte. In derselben Studie wurden auch die Auswirkungen des nicht-steroidalen Antiphlogistikums auf die Herzfrequenzvariabilität (HFV) untersucht. Die Gabe von Vedaprofen führte nach 30 Minuten zu einem leichten Absinken der LF-Komponente und einem leichten Anstieg der HF-Komponente mit einer gleichzeitigen Verringerung der LF/HF-Ratio, was auf eine Verschiebung in Richtung parasympathischer Dominanz schließen ließ. Auch in der vorliegenden Studie könnten die verabreichten NSAIDs durch die Analgesie und die dadurch verminderte Stressantwort zu derartigen Veränderungen der HFV geführt haben.

Die Opiode Morphin, Butorphanol und Levomethadon wurden ebenfalls bei einigen Pferden eingesetzt. Endogene Opiode sind an der Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse beteiligt, indem sie die Sekretion von ACTH inhibieren. Die Gabe des Opioid-Antagonisten Naloxon führte in einer Untersuchung von ALEXANDER und IRVINE (1995) bei Pferden zu einer Erhöhung der ACTH-Konzentrationen im Blut. Die zur Schmerztherapie eingesetzten Opiode bewirken demnach ein Absinken der ACTH- und Kortisolwerte (SELLON et al. 2004, ALOISI et al. 2011). Dieser inhibierende Effekt auf die ACTH-Sekretion wird auch in der vorliegenden Studie einen Einfluss auf die gemessenen ACTH- und Kortisolkonzentrationen gehabt haben. In manchen Untersuchungen wurde beobachtet, dass Morphin, Butorphanol und Buprenorphin beim Pferd zu einem

vorrübergehenden Anstieg der Herzfrequenz führen (KALPRAVIDH et al. 1984, CARREGARO et al. 2006, FIGUEIREDO et al. 2012, CARREGARO et al. 2014). Dabei kommt es wohl zu einer dosisabhängigen Stimulation des zentralen Nervensystems mit einer verstärkten Sympathikusaktivierung (MUIR et al. 1978, CARREGARO et al. 2006, FIGUEIREDO et al. 2012). Dies steht im Gegensatz zu Studien an Hunden, wo Morphin und Methadon zu einem Abfall der Herzfrequenz führten. Diese negativ chronotropen Effekte entstehen hierbei wahrscheinlich durch eine zentral medierte Erhöhung des vagalen Tonus (NAPIER et al. 1998, MAIANTE et al. 2009). Die Auswirkungen von Opioiden auf die HFV wurden an Menschen und Hunden untersucht. In einer Studie von MICHALOUDIS et al. (1998) führte die intramuskuläre Gabe von Morphin beim Menschen zwar zu keinen Veränderungen der Herzfrequenz, dafür aber zu einem Abfall der HF- und stärker noch der LF-Komponente, mit einem gleichzeitigen Absinken der LF/HF-Ratio. Dies ließ auf eine parasympathische Dominanz und damit auf einen vagotonischen Effekt von Morphin schließen. Beim Hund hingegen konnte nach Morphin-Applikation ein Absinken der Herzfrequenz, aber keine signifikanten Veränderungen der HF- oder LF-Komponente gemessen werden (NAPIER et al. 1998). Da es zum jetzigen Zeitpunkt keine Untersuchungen zu den Auswirkungen von Opioiden auf die HFV beim Pferd gibt, bleiben diese unklar.

Einer der beiden Koliker wurde chirurgisch versorgt und bekam während der Probenentnahme eine Dauertropfinfusion mit Lidocain. Lidocain ist ein Lokalanästhetikum, welches an spannungsabhängigen Natriumkanälen in den Zellen bindet, diese so blockiert und die Weiterleitung eines Aktionspotentials verhindert. Zusätzlich hat es antiarrhythmische Effekte am Herzen und wirkt beim Pferd potenziell prokinetisch, analgetisch und anti-inflammatorisch (COOK and BLIKSLAGER 2008, SANCHEZ and ROBERTSON 2014). ROBERTSON et al. (2005) untersuchten die analgetische Wirkung von systemisch verabreichtem Lidocain auf somatische und viszerale Schmerzen. Dabei hatte Lidocain einen guten analgetischen Effekt bei somatischen Schmerzen, die durch einen Hitzestimulus zugefügt wurden, aber nur geringe Effekte bei viszeralen Schmerzen, ausgelöst durch die Dehnung von Duodenum, Kolon und Rektum durch einen Ballon. Der positive klinische Effekt von Lidocain bei Pferden mit gastrointestinalen Erkrankungen erklärt sich daher wahrscheinlich vor allem durch seine anti-inflammatorischen Wirkungen (COOK and BLIKSLAGER 2008). Es ist daher unklar, ob das Lidocain einen Einfluss auf die Stresshormone hatte. Die Auswirkungen von Lidocain auf die autonome Regulation des Herzens wurden beim Hund und beim Menschen untersucht. Die Studien zeigten, dass es bei einer intravenösen Gabe von Lidocain zu einer Erhöhung der Herzfrequenz und einem Abfall der HF-Komponente der Herzfrequenzvariabilität kommt. Die Autoren vermuteten daher einen parasympatholytischen Effekt von Lidocain (DAVID et al. 1990, ABRAMOVICH-SIVAN et al. 1996). Ein eventueller analgetischer Effekt von Lidocain

würde dagegen eher zu einer Erhöhung der HF-Komponente führen, weshalb die genauen Auswirkungen auf die HFV unklar sind.

Der konservativ versorgte Koliker bekam den  $\alpha$ 2-Agonisten Xylazin. Dies erfolgte wegen starker Koliksymptomatik nur eine Stunde vor der Probenentnahme.  $\alpha$ 2-Agonisten wie Xylazin wirken sedierend und analgetisch. Sie haben daneben aber auch kardiovaskuläre Effekte und führen initial zu einer Bradykardie. Xylazin hat dabei die kürzesten Effekte auf die Herzfrequenz verglichen mit anderen  $\alpha$ 2-Agonisten (ENGLAND and CLARKE 1996). Nach der Gabe von Xylazin kehrt die Herzfrequenz nach ca. 10 Minuten auf ihren Ausgangswert zurück (MORTON et al. 2011).  $\alpha$ 2-Agonisten beeinflussen zusätzlich den Herzrhythmus und führen oft zu vermehrten Atrioventrikulären-Blocks (AV-Blocks) 1. und 2. Grades (MORTON et al. 2011). Diese sind jedoch hauptsächlich in den ersten Minuten nach der Injektion zu finden, danach steigt die Herzfrequenz wieder an und die AV-Blocks verschwinden meist (ENGLAND and CLARKE 1996). Da das Xylazin in der vorliegenden Studie eine Stunde vor der Messung der Herzfrequenz zur Schmerzevaluierung und der Aufzeichnung des EKGs für die Analyse der Herzfrequenzvariabilität verabreicht wurde, ist es wahrscheinlich, dass die kardiovaskulären Effekte die Untersuchungen nicht mehr beeinflusst haben. Die sedierenden Effekte von Xylazin halten dosisabhängig ca. 15 - 60 Minuten an (ENGLAND and CLARKE 1996). VAN LOON und VAN DIERENDONCK (2015) schlossen in ihrer Untersuchung zur Schmerzevaluierung bei viszerale Schmerzen diejenigen Pferde aus, die zuvor Xylazin bekommen hatten. Sie vermuteten einen möglichen Einfluss auf Verhaltensparameter, die Teil ihrer Schmerzskala darstellten. Sedierte Pferde senken den Kopf, lassen oft die Augenlider und die Unterlippe fallen und zeigen eine verringerte Wahrnehmung der Umgebung. Zusätzlich können sie schwitzen (ENGLAND and CLARKE 1996). In der vorliegenden Studie ist eine Beeinflussung des Verhaltens durch die Gabe von Xylazin möglich, aber wegen des zeitlichen Abstandes von einer Stunde zwischen Gabe und Evaluierung der Schmerzintensität, unwahrscheinlich. Die Auswirkungen von  $\alpha$ 2-Agonisten auf die Konzentrationen von ACTH und Kortisol sind widersprüchlich. PAKKANEN et al. (2018) fanden erhöhte ACTH- und Kortisolwerte 15 Minuten nach der Applikation von Romifidin. Diese sanken jedoch innerhalb von 60 Minuten wieder auf ihren Ausgangswert zurück. Die Autoren vermuteten, dass der Stress des Handlings die Erhöhung dieser Hormone zur Folge hatte. Andere Studien berichteten von gleichbleibenden oder sinkenden Kortisolkonzentrationen nach der Gabe von  $\alpha$ 2-Agonisten (RAEKALLIO et al. 1992, CARROLL et al. 1997).

Über die Auswirkungen von Heparin auf die Stresshormone und die HFV beim Pferd gibt es meines Wissens derzeit keine Studien. Ob die Antibiotika Amoxicillin und Gentamicin einen Einfluss auf die gemessenen Hormone oder die Parameter der HFV hatten, ist ebenfalls

unklar.

Einige Pferde bekamen zum Schutz der Magenschleimhaut den Protonenpumpenhemmer Omeprazol. Beim Menschen scheinen Omeprazol und Pantoprazol keinen Einfluss auf die Kortisolkonzentration zu haben (HOWDEN et al. 1986, DAMMANN et al. 1994). In vitro kam es jedoch an isolierten Nebennierenrindenzellen des Rindes zu einer dosisabhängigen Inhibition der ACTH-stimulierten Kortisolausschüttung. Dabei war die benötigte Omeprazolkonzentration aber um einiges höher als die Plasmaspiegel im klinischen Gebrauch (HOWDEN et al. 1986). Ob es beim Pferd zu einer Beeinflussung der Kortisolsekretion durch Omeprazol kommen kann, ist unklar.

Mussten Pferde in der vorliegenden Studie operiert werden, fand die Probenentnahme mindestens 12 Stunden nach dem Aufstehen aus der Narkose statt. Die Prämedikation bestand dabei aus Acepromacin, Amoxicillin, Gentamicin, Flunixin, Butorphanol und Xylazin. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit Ketamin und Diazepam. Zur Erhaltung wurden Isofluran und eine Dauertropfinfusion mit Xylazin eingesetzt. Zur Blutdruckstabilisierung bekamen die Pferde zusätzlich eine Dauertropfinfusion mit Dobutamin. Kurz vor dem Verbringen in die Aufwachbox wurde noch einmal ein Bolus Xylazin verabreicht. Verschiedene Autoren untersuchten den Einfluss einer Allgemeinanästhesie auf unterschiedliche Schmerzskalen. Dabei wurden die Pferde schon 4 - 8 Stunden nach dem Aufstehen aus der Narkose begutachtet. Keiner konnte einen signifikanten Einfluss der Narkose auf die ermittelten Schmerzgrade feststellen, sodass auch in der vorliegenden Studie eine Beeinflussung der ermittelten Schmerzintensitäten durch eine vorherige Allgemeinanästhesie unwahrscheinlich ist (VAN LOON et al. 2010, GRAUBNER et al. 2011, DALLA COSTA et al. 2014). Eine Narkose führt jedoch, auch ohne chirurgische Intervention, zu einer Stressreaktion des Körpers, was eine Erhöhung von ACTH und Kortisol zur Folge hat (TAYLOR 1989). Eine zusätzliche Dauertropfinfusion mit dem  $\alpha_2$ -Agonisten Medetomidin führte während einer Allgemeinanästhesie unter Isofluran zu signifikant niedrigeren Kortisolwerten verglichen mit Pferden, die lediglich kurz vor dem Ende der Narkose einen Bolus mit Xylazin erhielten. Dieser Unterschied war auch noch 30 Minuten nach dem Aufstehen signifikant. Eine Dauertropfinfusion mit  $\alpha_2$ -Agonisten scheint also die Stressantwort während der Anästhesie zu vermindern (CREIGHTON et al. 2012). In der vorliegenden Studie wurde ebenfalls eine balancierte Narkose mit Isofluran und einer Infusion mit Xylazin durchgeführt. Zusätzlich bekamen die Pferde kurz vor dem Verbringen in die Aufwachbox einen Xylazin-Bolus. Es ist also möglich, dass die Stressreaktion auf die Anästhesie dadurch gemildert wurde. In einer Untersuchung von TAYLOR (1989) sanken die ACTH- und Kortisolwerte schon 4 - 6 Stunden nach einer Halothan-Narkose ohne chirurgische Intervention wieder auf ihre Ausgangswerte

zurück. Auch in einer weiteren Studie von TAYLOR (1998) waren bei Pferden nach einer Allgemeinanästhesie ohne Operation die Kortisolkonzentrationen nach 6 Stunden fast wieder auf ihren Ausgangswert gesunken. Um einen ausreichenden zeitlichen Abstand zu möglichen Effekten der Narkose zu erreichen, wurden die ACTH- und Kortisolwerte in der vorliegenden Arbeit erst mindestens 12 Stunden nach dem Aufstehen aus der Narkose bestimmt. Inhalationsanästhetika inhibieren die Aktivität des Parasympathikus und führen entsprechend zu einer Erhöhung der Herzfrequenz und einer Verringerung der HF-Komponente der HFV beim Hund (PICKER et al. 2001). Auch beim Pferd führt Isofluran zu einem Anstieg der Herzfrequenz sowie einem geringgradigen Abfall der HF- und Anstieg der LF-Komponente der HFV (OEL et al. 2006). In der vorliegenden Studie wurde zur Erhaltung jedoch zusätzlich eine Dauertropfinfusion mit Xylazin verwendet. Daher sind die Veränderungen der HFV während der Narkose nicht eindeutig. Da Isofluran aber kaum metabolisiert und fast vollständig über die Lunge abgeatmet wird und zusätzlich eine geringere Löslichkeit im Blut und auch im Fett besitzt, ist seine Eliminationshalbwertszeit gering (DONALDSON et al. 2000). Auch das am Ende der Narkose verabreichte Xylazin sollte nach 12 Stunden keine wirksamen Plasmaspiegel mehr aufgewiesen haben. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die in der vorliegenden Studie für die Anästhesie verwendeten Medikamente einen Einfluss auf die Stresshormone oder die HFV hatten.

Da in der vorliegenden Studie die Kombinationen, Dosierungen und Applikationszeitpunkte der verschiedenen Medikamente stets unterschiedlich waren, konnten die Auswirkungen auf die ACTH- und Kortisolwerte nicht evaluiert werden. Trotzdem hatten manche Analgetika sicherlich einen Einfluss auf die Stresshormone. Doch wurden auch in anderen Studien Schmerzintensitäten evaluiert, Hormonmessungen durchgeführt oder die HFV gemessen, obwohl die Pferde zuvor Medikamente erhalten hatten (FAUST 2015, VAN LOON and VAN DIERENDONCK 2015).

In der vorliegenden Studie wurde für die gesamte Versuchsdurchführung ein Zeitraum von etwa 50 Minuten benötigt. Die Pferde wurden anhand einer zusammengesetzten Schmerzskala evaluiert, es wurde der TRH-Stimulationstest durchgeführt und ein Kurzzeit-EKG aufgezeichnet. Es wäre für das Pferd und seinen Besitzer, die zum Teil als Notfall in die Pferdeambulanz kamen, nicht tragbar gewesen, diese Zeit abzuwarten, bevor eine Therapie beginnen konnte. Zur Vermeidung von zusätzlichem Stress, sollten sich alle Pferde außerdem zuerst an die neue Umgebung in der Klinik gewöhnen. Um den zirkadianen Rhythmus von Kortisol zu berücksichtigen, wurden die Proben zudem immer zur gleichen Tageszeit zwischen 14:00 und 17:00 Uhr genommen. Die meisten Pferde standen also schon eine Zeit lang in der Klinik, bevor sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Daher war es nicht

möglich, diese Untersuchungen vor der medikamentösen Therapie durchzuführen. Unter Praxisbedingungen würden an Schmerzen leidende Pferde ebenfalls frühzeitig und umfangreich mit Analgetika abgedeckt werden. Betrachtet man die Fragestellung, ob ein schmerzbelastetes Pferd auf PPID getestet werden kann, würde in der Praxis die Diagnostik daher unter denselben Bedingungen wie in der vorliegenden Studie ablaufen.

### **5.1.3. Die Schmerzskala**

Bei der in der vorliegenden Studie verwendeten Schmerzskala zur Evaluierung der Schmerzintensitäten der Pferde handelte es sich um eine zusammengesetzte, multifaktorielle Skala. Die Verwendung solcher Systeme haben sich für die Schmerzbeurteilung bewährt (BUSSIÈRES et al. 2008, VAN LOON et al. 2010). Während eindimensionale Skalen entweder auf einer rein subjektiven Einschätzung der Schmerzintensität beruhen oder sehr stark von der klinischen Erfahrung des Benutzers abhängen, kann bei einer multifaktoriellen Skala durch die Beurteilung klinischer Kriterien zusammen mit klar definierten Verhaltensänderungen die Schmerzevaluierung objektiver erfolgen (GRAUBNER et al. 2011, VAN LOON et al. 2014).

Die Tiere in der vorliegenden Arbeit litten an unterschiedlichen Arten von Schmerzen. Pferde zeigen dabei verschiedene Verhaltensweisen bei differenten Schmerzzuständen (ASHLEY et al. 2005). Eine zuverlässige Schmerzskala sollte daher Parameter enthalten, die spezifisch für die jeweilige Art von Schmerz sind (VAN LOON et al. 2014, DE GRAUW and VAN LOON 2016). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie eine Schmerzskala verwendet, die einen allgemeinen Teil für alle schmerzbelasteten Tiere sowie zusätzlich spezifische Parameter für Pferde mit viszeralen Schmerzen (Kolik), Pferden mit Hufrehe-assoziierten Schmerzen und Pferden mit orthopädischen Schmerzen enthielt.

Der allgemeine Teil der Schmerzskala umfasste die klinischen Parameter Herz- und Atemfrequenz, die innere Körpertemperatur sowie das Vorhandensein von Schwitzen und Appetit. Zusätzlich wurden das allgemeine Verhalten und die Bereitschaft zur Bewegung beurteilt. Obwohl in einigen Untersuchungen zumindest eine moderate Korrelation zwischen der Höhe der Herz- und Atemfrequenz und der Schmerzintensität festgestellt wurde, wird die alleinige Messung dieser Parameter zur Schmerzbeurteilung nicht empfohlen (BUSSIÈRES et al. 2008, GRAUBNER et al. 2011). Diese Parameter sind für die Erfassung der Anwesenheit oder der Stärke von Schmerz nicht spezifisch, da viele weitere Faktoren wie kardiovaskuläre oder respiratorische Erkrankungen, Hypovolämie oder psychischer Stress einen Einfluss auf die Herz- und Atemfrequenz haben können (DE GRAUW and VAN LOON 2016). Ein Vorteil

der Verwendung klinischer Kriterien ist jedoch, dass es sich dabei um objektive Messergebnisse handelt, die nicht durch den Benutzer der Schmerzskala beeinflusst werden können. Sie sind daher oft in zusammengesetzte, multifaktorielle Schmerzskalen integriert (BUSSIÈRES et al. 2008, GRAUBNER et al. 2011, VAN LOON and VAN DIERENDONCK 2015).

Für die Beurteilung der Kolikschmerzen wurden die Parameter Darmmotilität, Scharren, Sich-gegen-den-Bauch-treten, Kopfbewegungen zur Flanke, Hinlegen/Wälzen und, falls die Pferde operiert wurden, auch die Reaktion auf die Palpation der Operationswunde gemessen. Dies sind allgemein akzeptierte Schmerzzeichen bei Pferden mit Kolik (PRITCHETT et al. 2003, ASHLEY et al. 2005, SUTTON et al. 2013). Die Reaktion auf die Palpation einer schmerzhaften Region war bei der Entwicklung der Composite Pain Scale (CPS) von BUSSIÈRES et al. (2008) einer der spezifischsten und sensitivsten Kriterien für die Beurteilung der Schmerzintensität bei Pferden mit experimentell induzierter Synovialitis. Die CPS wurde von VAN LOON et al. (2014) auch bei postoperativen Kolikern eingesetzt, wobei der Parameter „Reaktion auf die Palpation der Operationswunde“ ebenfalls gut mit dem allgemeinen Schmerzscore korrelierte. Auch in der vorliegenden Studie zeigte der operierte Koliker eine Schmerzreaktion bei Palpation der Bauchwunde. PRITCHETT et al. (2003) vermuteten Unterschiede zwischen akutem Kolikschmerz und postoperativem Schmerz nach einer Laparotomie. Pferde mit akuter Kolik zeigen in der Regel die als typisch für viszerale Schmerzen angesehenen Verhaltensweisen wie unter anderem Hinlegen, Scharren, Wälzen oder Zur-Flanke-schauen (TAYLOR et al. 2002). Diese Anzeichen sind mit einer Kolik assoziiert, bei der die Schmerzen durch einen vermehrten Druck im Gastrointestinaltrakt entstehen (BOATWRIGHT et al. 1996). In der Untersuchung von PRITCHETT et al. (2003) verglichen die Autoren die Verhaltensweisen von Pferden nach einer Laparotomie aufgrund akuter Kolik mit Kontrolltieren nach einer Anästhesie ohne Operation. Dabei verbrachten die operierten Pferde die meiste Zeit mit Ruhen und bewegten sich insgesamt viel weniger als die Kontrolltiere. Zwar zeigten die operierten Pferde auch die beschriebenen Verhaltensweisen bei viszeralen Schmerzen, der Zeitraum, in dem diese beobachtet werden konnten, war jedoch sehr gering verglichen mit dem Zeitraum, in dem sich die Tiere gar nicht bewegten. Die Autoren vermuteten daher, dass das Ausbleiben von freiwilliger Bewegung durch die Box ein wichtiger Indikator für postoperativen Schmerz ist. In der vorliegenden Studie wurde ein Koliker konservativ behandelt, bei dem anderen wurden die Schmerzen nach einer Laparotomie evaluiert. Dabei zeigte der postoperative Koliker häufiger die Verhaltensweisen Scharren und Sich-gegen-den-Bauch-treten als der konservative Koliker. Dieser legte sich hingegen vermehrt hin. Da es sich bei den Kolikern jedoch nur um zwei Tiere handelte, ist eine allgemeine Aussage über eventuelle Unterschiede im Schmerzverhalten von prä- und

postoperativen Kolikern aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Zusätzlich erfolgte die Schmerzevaluierung nur über einen Zeitraum von 5 Minuten, wohingegen in der Studie von PRITCHETT et al. (2003) die Pferde mehrmals für jeweils eine Stunde beobachtet wurden.

Für die spezielle Beurteilung von Hufrehe-assoziierten Schmerzen wurden in der vorliegenden Arbeit die Parameter Körperhaltung inklusive Gewichtsverlagerung, der Obel Grad, die Pulsation der Arteriae digitalis palmaris medialis und lateralis und die Reaktion auf die Hufzange verwendet. Auch RIETMANN et al. (2004a) verwendeten für die Evaluierung der Schmerzintensität bei Pferden mit Hufrehe den Obel Grad sowie die Reaktion auf die Hufzange. Zusätzlich beobachteten sie bei allen Tieren eine Gewichtsverlagerung von einem Vorderbein auf das andere und beurteilten dessen zeitliche Frequenz. HOOD et al. (2001) beschrieben zuvor ebenfalls eine Gewichtsverlagerung von einem Vorderbein auf das andere bei akuten und chronischen Hufrehepatienten, wobei die Frequenz mit Schwere der Erkrankung zunahm. Das Obel Grading System wurde speziell für die Beurteilung von Hufrehe-assoziiertem Schmerz entwickelt (OBEL 1948). Bei diesem System hängt die Beurteilung des Schmerzgrades zwar in gewissem Maße auch von der Erfahrung des Beobachtenden ab. Da es bisher aber keinen Goldstandard für die rein objektive Beurteilung von Lahmheiten gibt, ist die Bestimmung des Obel Grades zur Beurteilung der Schmerzen bei Pferden mit Hufrehe dennoch ein zuverlässiges Werkzeug, solange der Beobachtende klinische Erfahrung besitzt (MENZIES-GOW et al. 2010, VINUELA-FERNANDEZ et al. 2011). Die Pulsation der Aa. digitalis palmaris medialis und lateralis ist nach RIETMANN et al. (2004a) hingegen kein guter Indikator für die Differenzierung zwischen verschiedenen Schmerzintensitäten. In ihrer Untersuchung zeigten alle Pferde mit Hufrehe eine deutliche Pulsation. In der vorliegenden Studie zeigten drei der vier Pferde mit Hufrehe eine mittelgradig verstärkte Pulsation, ein Tier zeigte eine hochgradige Pulsation. Das Pferd mit der stärksten Pulsation wies dabei einen Obel Grad 2 und insgesamt eine Schmerzintensität von 35 % auf, während ein anderes Pferd mit nur mittelgradiger Pulsation einen Obel Grad 3 mit einer Schmerzintensität von 48 % zeigte. Die anderen beiden Tiere mit mittelgradiger Pulsation hatten hingegen lediglich einen Obel Grad von 2 bzw. 1 mit Schmerzintensitäten von 26 %. Da die Messung der Pulsationsstärke dazu nur subjektiv erfolgen kann, ist dies wohl kein geeigneter Parameter zu Einschätzung des Schmerzgrades bei Pferden mit Hufrehe.

Die Pferde, die an einer anderen orthopädischen Erkrankung außer Hufrehe litten, wurden mit den Parametern Körperhaltung, dem Lahmheitsgrad und der Reaktion beim Aufheben der kontralateralen Gliedmaße evaluiert. Pferde, die Schmerzen in einer Gliedmaße haben, entlasten diese häufig. Dies ist in einer abnormalen Körperhaltung feststellbar (RAEKALLIO

et al. 1997b, PRICE et al. 2003). Dadurch, dass die Pferde die erkrankte Gliedmaße nicht belasten wollen, kann es schwierig bis unmöglich sein, die kontralaterale Gliedmaße aufzuheben. Die Beurteilung des Lahmheitsgrades erfolgte nach der Verbalen Rating Skala der American Association of Equine Practitioners (AAEP) zur Beurteilung der Lahmheit von Pferden (AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS 1991, WAGNER 2010). Die Verwendung dieser Skala ist jedoch in vielen Teilen subjektiv und hängt stark von der klinischen Erfahrung des Benutzers ab, besonders wenn die Lahmheit nur schwach ist (HEWETSON et al. 2006, WAGNER 2010). In der vorliegenden Studie litten neun der 15 schmerzbelasteten Pferde an einer orthopädischen Erkrankung und wurden bezüglich ihres Lahmheitsgrades beurteilt. Dabei zeigten fast alle Pferde einen Lahmheitsgrad von 4/5 oder 5/5. Ein Lahmheitsgrad von 4/5 wird als hochgradige Lahmheit definiert, die schon im Schritt offensichtlich ist. Ein Lahmheitsgrad von 5/5 steht für eine höchstgradige Lahmheit, mit nur kurzzeitiger Belastung oder völliger Entlastung der Gliedmaße. Nur ein Pferd zeigte einen Lahmheitsgrad von 3/5, der mit einer im Trab kontinuierlich erkennbaren Lahmheit definiert ist (WAGNER 2010). Alle Pferde zeigten somit eine deutliche Lahmheit. KEEGAN et al. (2010) beschrieben, dass bei der Verwendung dieser Skala die Interobserver-Übereinstimmung bei deutlichen Lahmheiten um einiges höher ist als bei schwachen Lahmheitsgraden von  $\leq 1,5/5$ . Da die Lahmheiten in der vorliegenden Studie deutlich waren und der Lahmheitsgrad immer durch die gleiche Person beurteilt wurde, ist es wahrscheinlich, dass die Ergebnisse nicht wesentlich durch die klinische Erfahrung oder subjektive Einschätzung des Beobachters beeinflusst wurden.

Insgesamt hatten die Pferde in der vorliegenden Studie nur gering- bis mittelgradige Schmerzen. Dies lag sicherlich zum größten Teil an der analgetischen Therapie. Weiterhin ist zu beachten, dass die Äußerungen von Schmerzzeichen individuell unterschiedlich sind, aber auch von der Rasse abhängen können. Bei den 15 untersuchten schmerzbelasteten Pferden handelte es sich um ein Kaltblut, zehn Warmblüter, ein Vollblut und drei Ponys. Ponys gelten als stoischer und zeigen oft weniger Schmerzverhalten als Warm- oder Vollblüter (TAYLOR et al. 2002). Da in der vorliegenden Arbeit jedoch nur wenige Ponys vertreten waren, hatte dies wohl, wenn überhaupt, nur einen geringen Einfluss auf die gemessenen Schmerzintensitäten. Ein weiterer limitierender Faktor könnte die nur kurze Beobachtungszeit bei der Schmerzevaluation der Pferde sein. Bei den Kolikern wurde die Häufigkeit des Auftretens bestimmter Verhaltensweisen innerhalb von 5 Minuten beurteilt. Dies wurde in der gleichen Weise zuvor von BUSSIÈRES et al. (2008) durchgeführt. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse von PRITCHETT et al. (2003), bei denen die postoperativen Koliker nur selten Schmerzverhalten zeigten, könnte dieser Beobachtungszeitraum jedoch zu kurz gewesen sein. Ob jedoch eine Beurteilungsdauer von 10 Minuten, wie sie VAN LOON und VAN

DIERENDONCK (2015) bei der Evaluierung viszeraler Schmerzen verwendeten, ein anderes Ergebnis erzielt hätten, ist unklar. Da die Schmerzintensitäten in der vorliegenden Studie unter Klinikbedingungen evaluiert wurden und sich die Probenentnahmen sowie die Aufzeichnung des EKGs daran anschlossen, wäre eine noch längere Beobachtungsdauer wahrscheinlich nicht praktikabel gewesen.

#### **5.1.4. Messung von ACTH und Kortisol**

Die Blutentnahme zur Messung von ACTH und Kortisol erfolgte entweder aus einem bereits vorhandenen Venenverweilkatheter oder direkt aus der Vena jugularis. Diese Art der Manipulation könnte zu Stress und somit zu einer Erhöhung der Stresshormone geführt haben. MAY (2007) konnte beim Pferd jedoch keine Beeinflussung der Kortisolkonzentrationen durch die Blutentnahme feststellen. Auch bei FOUCHÉ et al. (2015) kam es zu keinem signifikanten Anstieg des ACTH-Wertes durch die Venenpunktion. Da die Pferde in der vorliegenden Studie alle an Menschen gewöhnt waren und keines der Tiere während der Blutentnahme Stressreaktionen zeigte, ist es unwahrscheinlich, dass die Ergebnisse davon beeinflusst wurden.

Alle Pferde hatten nach Ankunft in der Pferdeklinik mindestens 14 Stunden Zeit, sich an ihre neue Umgebung zu gewöhnen. Außerdem wurde darauf geachtet, dass keines der Pferde während der Untersuchung aufgeregt war. Zusätzlich erfolgte die Probenentnahme nachmittags immer zwischen 14:00 und 17:00 Uhr. Zu dieser Zeit wurde nicht gefüttert, sodass Stress durch die bevorstehende Fütterung verhindert wurde. Gleichzeitig wurde so der zirkadiane Rhythmus von Kortisol berücksichtigt (LARSSON et al. 1979, CORDERO et al. 2012).

#### **5.1.5. Durchführung des TRH-Stimulationstests**

Beim TRH-Stimulationstest wurden ACTH und Kortisol 30 Minuten nach der intravenösen Applikation von TRH gemessen. Die TRH-Dosis von 1 mg pro Tier entsprach dabei der in anderen Studien angewendeten Dosierung (MCFARLANE et al. 2006, BEECH et al. 2007, GOODALE et al. 2015). Ob die Menge des injizierten TRHs die Ausschüttung von ACTH beeinflusst, wurde bisher nicht untersucht. Unmittelbar nach der Applikation zeigten drei Pferde ein vorübergehendes Gähnen, Kauen oder Flehmen. Auch in anderen Studien wurden diese milden Nebenwirkungen beobachtet, daneben auch leichtes Muskelzittern, Lecken der

Lippen und Husten (BEECH et al. 2007, GOODALE et al. 2015).

Beim TRH-Stimulationstest erreichen die ACTH-Werte nach 2 - 10 Minuten einen Peak und sinken dann innerhalb einer Stunde wieder auf ihren Ausgangswert zurück (FUNK et al. 2011, BEECH et al. 2011b). Nach einer aktuellen Empfehlung der Equine Endocrinology Group (Schott et al. 2017) wird für den TRH-Stimulationstest die Messung von ACTH 10 Minuten nach TRH-Stimulation empfohlen. Der Grenzwert für ein positives Testergebnis liegt dabei bei 110 pg/ml. In der vorliegenden Studie fand die erneute Hormonbestimmung 30 Minuten nach der TRH-Applikation statt. BEECH et al. (2007) berichteten bei der Differenzierung zwischen gesunden Pferden und solchen mit PPID von einer hohen Sensitivität und Spezifität für durch TRH stimulierte ACTH-Konzentrationen von > 35 pg/ml. Bei dem für die Hormonanalyse verantwortlichen Labor Synlab.vet in Berlin war für den TRH-Stimulationstest eine ACTH-Bestimmung nach 10 und nach 30 Minuten möglich. Der obere Grenzwert für den ACTH-Wert 30 Minuten nach TRH-Stimulation betrug dabei ebenfalls 35 pg/ml. Da die Untersuchungen meist von einer Person allein durchgeführt und die Blutproben direkt nach der Entnahme zentrifugiert und eingefroren wurden, war diese Art der Durchführung für das Zeitmanagement praktikabler.

#### **5.1.6. Messung der Herzfrequenzvariabilität**

Für die Analyse der Herzfrequenzvariabilität wurde ein Kurzzeit-EKG aufgezeichnet. Daraus wurden 2-minütige, artefaktfreie Sequenzen herausgeschnitten. Die Bearbeitung der Daten und die Entfernung von Artefakten ist von großer Bedeutung. Artefakte können entstehen durch schlecht sitzende EKG-Elektroden, fehlerhaftes Equipment, Extrasystolen oder Störungen durch Aktionspotentiale der Muskulatur. Die Berechnung vieler Parameter der HFV beruht auf der Art und dem Umfang der Variabilität innerhalb der Daten, sodass bei der Analyse von Kurzzeit-Sequenzen schon ein einziger Fehler die Ergebnisse beeinflussen kann (VON BORELL et al. 2007). Aufgrund der Schmerzen der Patienten und der damit zum Teil verbundenen Unruhe war es nicht möglich, aus jeder EKG-Datei 5-minütige Ausschnitte ohne Bewegungsartefakte zu gewinnen, so wie es von der TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY (1996) zur Standardisierung empfohlen wird. Die ständige Gewichtsverlagerung bei manchen Pferden mit Hufrehe oder die aktiven Schmerzzeichen bei den Pferden mit Kolik konnten nicht unterdrückt werden. EKG-Sequenzen von 2 Minuten Länge sind aber ausreichend, um den HF- und LF-Bereich beim Pferd beurteilen zu können (ZEBISCH et al. 2014). HALMER et al. (2014) verwendeten für die Berechnung des

zeitbezogenen Parameters RMSSD (root mean square of successive RR differences) bei Pferden mit Hufrehe entweder 100 oder 500 aufeinander folgende Herzschläge und deuteten auf die Notwendigkeit von störungsfreien, zusammenhängenden Datensequenzen hin. Den Autoren nach war auch die Analyse von nur 100 Datenpunkten aussagekräftig (HALMER et al. 2014).

Die zeitliche Nähe der Durchführung des TRH-Stimulationstests zur Aufzeichnung des EKGs könnte die Parameter der HFV beeinflusst haben. In der vorliegenden Studie wurde das EKG meistens nach Ende des TRH-Stimulationstests aufgezeichnet. Dabei betrug der zeitliche Abstand in der Regel 30 bis 60 Minuten. Bei drei der schmerzbelasteten Pferde musste das EKG jedoch bereits kurz nach der TRH-Applikation aufgezeichnet werden. Bei diesen Pferden wurde die EKG-Aufzeichnung innerhalb der 30 Minuten zwischen TRH-Injektion und erneuter Hormonbestimmung durchgeführt, da die Probenentnahme aufgrund des Klinikablaufs oder aufgrund der Schmerzen der Pferde zeitnah erfolgen musste. Der kürzeste Abstand betrug dabei 5 Minuten. BROWN (1981) zeigte, dass direkt ins Gehirn verabreichtes TRH bei Ratten zu einem signifikanten Anstieg der Katecholaminkonzentrationen im Plasma führt. Dabei kam es 10 Minuten nach der Gabe von TRH zu einem Peak, die Konzentrationen waren nach 40 Minuten immer noch erhöht. Wurde das TRH intravenös injiziert, kam es zu keinem Anstieg der Katecholamine. Die Autoren vermuteten, dass TRH im Gehirn an der Regulation des Sympathikus beteiligt ist (BROWN 1981). Bei Kaninchen führte auch die intravenöse Gabe von TRH zu einem Anstieg von Noradrenalin und Epinephrin. Dieser Effekt zeigte sich 30 Minuten nach der Injektion und hielt für 2 Stunden an (LIU et al. 1989). COUPLAND et al. (1995) beobachteten beim Menschen, dass die intravenöse Gabe von 0,5 und 1 mg synthetischem TRH zwar zu keinen Veränderungen der Herzfrequenz, aber zu einem vorübergehenden Blutdruckanstieg führte. Der Blutdruck normalisierte sich jedoch schon nach 6 Minuten wieder. Die Autoren vermuteten, dass auch hier die zentrale Aktivierung des Sympathikus durch TRH eine Rolle spielte (COUPLAND et al. 1995). Über die Auswirkungen von TRH auf die Herzfrequenz oder die HFV des Pferdes gibt es derzeit keine Untersuchungen. Es ist möglich, dass die frequenzbezogenen Parameter bei den oben genannten Pferden vom TRH-Stimulationstest beeinflusst wurden. Ob das TRH bei den Pferden wirklich einen Einfluss auf das autonome Nervensystem hatte, ist während des Schmerzzustandes jedoch nicht zu beantworten, da auch der Schmerz zu einer Aktivierung des Sympathikus führen kann. Während der Kontrolluntersuchungen musste das EKG ebenfalls bei vier Pferden aufgrund des Klinikablaufs kurz nach der TRH-Applikation aufgezeichnet werden. Auch hier betrug der kürzeste Abstand 5 Minuten.

Die sympathovagale Balance wird mit der LF/HF-Ratio beschrieben. Ist dieser Quotient erhöht, deutet dies auf eine im Verhältnis verstärkte Sympathikusaktivität hin (VON BORELL et al.

2007). Bei den oben genannten vier Pferden lag die die LF/HF-Ratio  $\leq 1$  und wies somit nicht auf eine sympathische Dominanz hin. Es ist daher wenig wahrscheinlich, dass es in der vorliegenden Studie zu einer Beeinflussung der HFV durch das injizierte TRH kam.

## **5.2. Diskussion der Ergebnisse**

### **5.2.1. Herzfrequenz, Atemfrequenz und innere Körpertemperatur**

In der vorliegenden Studie konnte kein signifikanter Anstieg der Herz- oder Atemfrequenz während des Schmerzzustandes festgestellt werden. Die Herzfrequenz war während des Schmerzzustandes und während der Kontrolluntersuchung gleich, die Atemfrequenz war während des Schmerzzustandes geringgradig erhöht, jedoch nicht signifikant. Dies deckt sich mit Ergebnissen von PRICE et al. (2003), die ebenfalls keinen Unterschied der Herz- und Atemfrequenz zwischen schmerzbelasteten Pferden nach Arthroskopie und schmerzfreien Kontrolltieren fanden. Auch RAEKALLIO et al. (1997a) konnten keinen Unterschied der Herzfrequenz zwischen Pferden feststellen, die nach einer Arthroskopie ein NSAID erhielten und Pferden, die nicht analgetisch behandelt wurden, obwohl diese insgesamt einen höheren Schmerzindex aufwiesen. HOOD (1999) berichtete hingegen von einer signifikant erhöhten Herzfrequenz bei Pferden mit akuter Hufrehe. In einer anderen Studie hatten Pferde nach Laparotomie zwar eine höhere Herzfrequenz als schmerzfreie Kontrolltiere, die Atemfrequenz unterschied sich jedoch nicht zwischen den Gruppen (PRITCHETT et al. 2003). Obwohl die Messung der Herz- und Atemfrequenz Teil vieler Schmerzbeurteilungsskalen ist, wird ihre Korrelation mit der Schmerzintensität nur als moderat beschrieben (BUSSIÈRES et al. 2008, GRAUBNER et al. 2011).

In der vorliegenden Studie unterschied sich lediglich die innere Körpertemperatur signifikant zwischen Schmerzzustand und Kontrolle. Diese war bei den Pferden mit Schmerzen erhöht. MAY (2007) konnte sogar einen direkten Zusammenhang zwischen der Körpertemperatur und einem subjektiv beurteilten Schmerzgrad feststellen. Pferde mit stärkeren Schmerzen hatten dabei auch eine höhere Körpertemperatur. Die Autorin erklärte dies mit einer vermehrten motorischen Bewegung der Tiere, während diese Schmerzverhalten zeigten. Bei Ratten, Mäusen und Menschen führen viele psychische Stressoren zu einer psychologischen, Stress-induzierten Hyperthermie (PSH) (KATAOKA et al. 2014). Beim Pferd kann der Stress eines langen Transportes ebenfalls zu einer erhöhten Körpertemperatur führen (ENDO et al. 2017, PADALINO et al. 2017). BUSSIÈRES et al. (2008) hingegen bezeichneten die innere

Körpertemperatur bei der Entwicklung ihrer Composite Pain Scale als nicht spezifisches Kriterium für Schmerz. An Schmerzenleidende Hunde mit Knochenfrakturen zeigten ebenfalls keinen Unterschied der inneren Körpertemperatur im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren (SRITHUNYARAT et al. 2017). In der vorliegenden Arbeit könnte eine verstärkte Motorik durch das aktive Schmerzverhalten oder der mit den Schmerzen verbundene Stress zu der beobachteten Erhöhung der Körpertemperatur geführt haben.

### **5.2.2. Hämatokrit, Totalprotein, Leukozytenzahl, Laktat und pH-Wert**

Bei den gemessenen Blutparametern unterschied sich lediglich der pH-Wert signifikant zwischen Schmerzzustand und Kontrolluntersuchung. Während der Schmerzen betrug er im Mittel  $7,38 \pm 0,3$ , bei der Kontrolluntersuchung  $7,37 \pm 0,3$ . Bei MAY (2007) hatten Pferde mit hochgradig gestörtem Allgemeinbefinden einen durchschnittlichen pH-Wert von  $7,37 \pm 0,2$ . Dieser lag ebenfalls höher als bei gesunden Kontrolltieren, unterschied sich aber nicht signifikant. Da in der vorliegenden Studie die Abweichung von 0,01 zwischen Schmerzen und Kontrolle nur gering ist und beide pH-Werte im Referenzbereich liegen (7,35 – 7,45), ist dieser Unterschied wahrscheinlich auf physiologische individuelle Schwankungen im pH-Wert zurückzuführen.

### **5.2.3. ACTH**

Schmerz führt zu einer Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse), wodurch es zu einer Ausschüttung von ACTH und Kortisol kommt (MOLONY and KENT 1997). Bei Pferden mit starken Schmerzen wird daher von der Messung des ACTH-Wertes zur PPID-Diagnostik abgeraten (DONALDSON et al. 2004, DURHAM et al. 2014, DURHAM 2016, SECOMBE et al. 2018). Doch wie stark die Schmerzen sein müssen, um eine signifikante Erhöhung des ACTH-Wertes zu bewirken, ist unklar. In der vorliegenden Studie führten gering- bis mittelgradige Schmerzen zu keinem signifikanten Anstieg der ACTH-Konzentrationen im Blut. Zusätzlich lag der ACTH-Wert bei keinem der schmerzbelasteten Pferde  $> 36$  pg/ml, wodurch es zu einem falsch-positiven Testergebnis bei der PPID-Diagnostik gekommen wäre.

Um die Auswirkungen von Schmerz auf die Stresshormone zu beurteilen, wurde in den meisten Studien Kortisol und nicht ACTH gemessen (RAEKALLIO et al. 1997a, MELLOR et al. 2002, PRITCHETT et al. 2003, RIETMANN et al. 2004a, BUSSIÈRES et al. 2008). Die

Messung des ACTH-Wertes erfolgte in der Regel im Zusammenhang mit dem durch eine Erkrankung ausgelösten Stress (MARTIN et al. 2008, NIINISTÖ et al. 2010, TOWNS et al. 2010, AYALA et al. 2012). AYALA et al. (2012) untersuchten die Auswirkungen verschiedener Erkrankungen auf die ACTH-Werte beim Pferd. Dabei wurden Pferde mit Hufrehe, Kolik, akuten Erkrankungen wie einem Trauma oder Arthritis, chronischen Erkrankungen wie Arthrose und Pferde, die unter Allgemeinanästhesie kastriert wurden, evaluiert. Die ACTH-Werte waren in allen Krankheitsgruppen außer den Kastraten signifikant höher als bei gesunden Kontrolltieren. Der Schweregrad der jeweiligen Erkrankung oder der mit ihr einhergehende Schmerz wurden in der Studie aber nicht gesondert beurteilt. Trotzdem ist davon auszugehen, dass sie mit einem gewissen Maß an Schmerzen einhergingen. Die höchsten Werte wiesen die Pferde mit Hufrehe, Kolik und akuten Erkrankungen auf. In jeder Gruppe außer den Kastraten lagen die mittleren ACTH-Werte  $> 36$  pg/ml und waren damit so stark erhöht, dass es zu einem falsch-positiven Ergebnis bei der PPID-Diagnostik gekommen wäre. Dass es, im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, zu der signifikanten Erhöhung der ACTH-Werte kam, könnte an der Tatsache liegen, dass die Pferde in der Studie von AYALA et al. (2012) keinerlei Medikamente erhielten, bevor die Messungen durchgeführt wurden. Zusätzlich erfolgte die Probenentnahme nur 30 - 60 Minuten nach Ankunft in der Pferdeklinik und nachdem die Pferde diagnostiziert wurden. Der Transport im Pferdeanhänger, eine neue Umgebung und die ungewohnten Behandlungen zur Diagnostik wie zum Beispiel die rektale Untersuchung sind ebenfalls Stressoren für das Pferd, sodass diese zu der Erhöhung der ACTH-Sekretion beigetragen haben könnten (HADA et al. 2003, FAZIO et al. 2008, SCHONBOM et al. 2015).

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte bei Pferden mit unterschiedlichen Erkrankungen kein Unterschied der ACTH-Konzentrationen festgestellt werden. Die Werte waren in den verschiedenen Krankheitsgruppen annähernd gleich. In der Studie von AYALA et al. (2012) wiesen Pferde mit Kolik, Hufrehe oder einem Trauma ebenfalls ähnliche ACTH-Werte auf. Ein möglicher Unterschied zwischen den Krankheitsgruppen wurde hier jedoch nicht statistisch getestet.

Auch zwischen den beiden Schmerzgruppen mit verschiedenen Schmerzintensitäten unterschieden sich die ACTH-Konzentrationen nicht signifikant. Ein Zusammenhang zwischen der Schmerzintensität und der Höhe der ACTH-Werte gab es ebenfalls nicht. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von NIINISTÖ et al. (2010) und TOWNS et al. (2010). NIINISTÖ et al. (2010) untersuchten die ACTH-Konzentrationen von Pferden mit Kolik verschiedener Schweregrade und evaluierten in diesem Zusammenhang auch die Intensitäten der Schmerzen. Dies erfolgte jedoch subjektiv und nicht anhand einer zusammengesetzten

Schmerzskala. Der Schweregrad der Kolik und die damit verbundene Schmerzintensität korrelierten signifikant mit der Höhe der ACTH-Werte. Die durchschnittlichen ACTH-Konzentrationen von Pferden mit gering- und mittelgradiger Kolik lagen dabei aber  $< 36$  pg/ml und unterschieden sich nicht signifikant von gesunden Kontrolltieren, wie es auch in der vorliegenden Studie der Fall war. Zeigten die Pferde in der Studie von NIINISTÖ et al. (2010) jedoch hochgradige Koliksymptome, waren die durchschnittlichen ACTH-Werte signifikant höher als bei den Kontrolltieren und überschritten 36 pg/ml. TOWNS et al. (2010) untersuchten ebenfalls die ACTH-Werte von Pferden mit verschiedenen Schweregraden von systemischen Erkrankungen wie z.B. Kolik. Auch hier war die Höhe des ACTH-Wertes mit der Schwere der Krankheit assoziiert. Hochgradig kranke Pferde hatten mit  $97 \pm 113$  pg/ml signifikant höhere ACTH-Werte als mittel- ( $33,6 \pm 52,3$  pg/ml) oder geringgradig kranke Tiere ( $21,9 \pm 20$  pg/ml).

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Studie mit den beiden oben genannten Untersuchungen ist aber kritisch zu betrachten, da die Schmerzen in der vorliegenden Arbeit nicht nur abdominalen Herkunft waren, sondern vor allem Pferde mit durch Hufrehe oder einer orthopädischen Erkrankung bedingten Schmerzen untersucht wurden. Eine Kolik kann viele Ursachen haben, die zum Teil mit schwerwiegenden systemischen Auswirkungen wie einem hypovolämischen Schock oder einer Endotoxämie einhergehen (AYALA et al. 2012). Auch inflammatorische Zytokine können die Aktivität der HHN-Achse verstärken. GOLD et al. (2007) wiesen deutlich höhere ACTH-Werte bei septischen Fohlen im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren nach. Diese Faktoren könnten in den Studien von NIINISTÖ et al. (2010) und TOWNS et al. (2010) neben dem reinen Stressor Schmerz zu den stark erhöhten ACTH-Werten bei Pferden mit hochgradiger Kolik und der positiven Korrelation mit dem Schweregrad der Krankheit geführt haben. Untersuchungen zu den Auswirkungen verschiedener Schmerzintensitäten auf die ACTH-Konzentrationen bei Pferden mit orthopädischen Schmerzen gibt es nach meinen Kenntnissen derzeit nicht.

In der vorliegenden Studie wurde bei drei Tieren während des Schmerzzustandes ein niedrigerer ACTH-Wert gemessen als bei der Kontrolluntersuchung. Zwei dieser Pferde litten an einer Hufrehe, das andere Pferd an Hufrehe und Arthrose. Es ist möglich, dass bei diesen Tieren die Zeitdauer des Schmerzes einen Einfluss auf die ACTH-Sekretion hatte. Bei andauernder Stimulation der HHN-Achse könnte es zu einem Aufbrauchen von Reserven kommen, wodurch die Stresshormone sinken (TENNANT and HERMANN 2002, MUHTZ et al. 2013, TENNANT 2017). AYALA et al. (2012) fanden bei Pferden mit chronischen Erkrankungen wie Arthrose jedoch trotzdem signifikant höhere ACTH-Werte als bei gesunden Kontrolltieren. Nach TENNANT (2017) führen chronische Schmerzen beim Menschen zunächst zu einem Anstieg, wenn der Schmerz jedoch zu lange anhält, zu einem Abfall der

ACTH-Konzentrationen. In der vorliegenden Studie wurde nicht erfasst, wie lange der Schmerz schon bestand, sondern dieser als Momentaufnahme betrachtet. Es ist daher möglich, dass manche Pferde schon für längere Zeit an Schmerzen litten, bevor sie in der Pferdeklinik vorstellig wurden und dass der chronische Schmerz zu den verminderten ACTH-Konzentrationen geführt hat.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der vorliegenden Studie darauf hin, dass gering- bis mittelgradige Schmerzen die ACTH-Sekretion beim Pferd nicht signifikant beeinflussen. Auch andere Stressoren müssen beim Pferd stark sein, um einen deutlichen Anstieg der ACTH-Konzentrationen zu bewirken (ALEXANDER et al. 1991, TOWNS et al. 2010). Beim Menschen führen wohl ebenfalls nur hochgradige Schmerzen zu einem Anstieg von ACTH (TENNANT 2012, TENNANT 2013b). Eine Messung des ACTH-Wertes zur PPID-Diagnostik wäre somit bei gering- bis mittelgradigen Schmerzen möglich.

#### **5.2.4. ACTH nach TRH-Stimulation**

Die intravenöse Applikation von TRH führte bei den Pferden der vorliegenden Studie während des Schmerzzustandes und bei der Kontrolluntersuchung zu einem signifikanten Anstieg der ACTH-Konzentrationen. Dies bestätigt die Ergebnisse von MCFARLANE et al. (2006) und BEECH et al. (2007), wonach TRH die ACTH-Ausschüttung beim Pferd stimuliert.

Auffallend war jedoch, dass bei drei der 15 an Schmerzen leidenden Pferde der ACTH-Wert nach der TRH-Stimulation sank. Von diesen drei Pferden konnte auch eine Kontrolluntersuchung durchgeführt werden, sodass ein direkter Vergleich der ACTH 30-Werte bei Schmerzen und bei der Kontrolle möglich war. Während der Kontrolluntersuchung zeigten diese drei Pferde wiederum einen Anstieg der ACTH-Konzentrationen nach TRH-Stimulation. Dies war bei allen Pferden während der Kontrolluntersuchung der Fall. Trotz fehlender Signifikanz konnte in der deskriptiven Statistik zusätzlich beobachtet werden, dass der durchschnittliche ACTH 30-Wert während des Schmerzzustandes tendenziell geringer war als bei der Kontrolluntersuchung. Auch der Anstieg des ACTHs nach TRH-Stimulation (ACTH Diff) war bei den Pferden mit Schmerzen geringer als bei der Kontrolluntersuchung, jedoch ebenfalls nicht signifikant.

Der Grund für die zum Teil fehlende stimulierende Wirkung des TRHs und die niedrigen ACTH 30-Werte während des Schmerzzustandes könnte ein fehlendes Ansprechen der Hypophyse auf TRH sein. Beim Pferd wurden die Auswirkungen von Schmerz auf den TRH-

Stimulationstest bisher jedoch nicht untersucht. Beim Menschen zeigten einige Patienten mit chronischen Rückenschmerzen eine verminderte Reaktion der Hypophyse auf TRH (FRANCE et al. 1986). Hierbei wurde jedoch die Wirkung des TRH auf das Thyreoidea-stimulierende Hormon (TSH) und der Zusammenhang zwischen chronischen Rückenschmerzen und Depression evaluiert. Als Grund für die verminderte TSH-Reaktion vermuteten die Autoren eine mögliche Herunterregulierung der TRH-Rezeptoren aufgrund einer chronischen Hypersekretion von TRH. Schmerz führt zu einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems (GUNNAR and QUEVEDO 2007). Katecholamine haben gleichzeitig einen stimulierenden Effekt auf die TRH-Sekretion im Hypothalamus (GRIMM and REICHLIN 1973). Es könnte in der vorliegenden Studie also eventuell zu einer Beeinflussung des TRH-Stimulationstests durch Schmerz gekommen sein. Ob es beim Pferd durch Schmerzen zu einer Hypersekretion von TRH und folglich einer Herunterregulierung der TRH-Rezeptoren in der Adenohypophyse kommen könnte, ist jedoch unklar. Auch inwieweit die verabreichten Medikamente den TRH-Stimulationstest beeinflusst haben könnten, bleibt fraglich.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Ergebnissen wies eines der schmerzbelasteten Pferde einen erhöhten ACTH 30-Wert von 40,2 pg/ml auf. Bei der Diagnose der PPID liegt der obere Grenzwert für ACTH, welches 30 Minuten nach TRH-Stimulation gemessen wird, bei 35 pg/ml (BEECH et al. 2007). Bei der Kontrolluntersuchung des gleichen Pferdes lag der ACTH 30-Wert bei 31,7 pg/ml, also wieder im Referenzbereich. Bei diesem Pferd herrschten bei der Durchführung des ersten TRH-Stimulationstests laute Geräusche im Stall, sodass es zu einer Stressreaktion gekommen sein könnte. Da die Schmerzintensität bei diesem Pferd mit 26 % nur geringgradig war, ist es wahrscheinlich, dass der Stress und nicht der Schmerz den ACTH 30-Wert beeinflusst hat. Dies zeigt, dass Stress wie etwa eine laute Umgebung einen deutlichen Einfluss auf den TRH-Stimulationstest haben kann und bei der Durchführung in jedem Fall zu vermeiden ist.

Ein anderes Pferd dagegen hatte während der Kontrolluntersuchung einen erhöhten ACTH 30-Wert von 52,9 pg/ml. Während des Schmerzzustandes betrug dieser bei dem gleichen Tier nur 26,2 pg/ml. Auch BEECH et al. (2007) fanden in ihrer Studie bei einem gesunden Pferd ohne Anzeichen auf PPID erhöhte ACTH-Werte nach TRH-Stimulation. Das Tier hatte dabei einen normalen ACTH-Basalwert und wies in der darauffolgenden Sektion auch keine Veränderungen der Pars intermedia auf. Grund für den positiven TRH-Stimulationstest der Pferde in der vorliegenden Studie und der Untersuchung von BEECH et al. (2007) könnte die Jahreszeit gewesen sein. Genau wie der ACTH-Basalwert wird auch der TRH-Stimulationstest von der Jahreszeit beeinflusst, mit höheren ACTH-Werten im Herbst (FUNK et al. 2011). DIEZ DE CASTRO et al. (2014) fanden erhöhte ACTH-Konzentrationen nach TRH-Stimulation in

den Monaten Juli bis September verglichen mit März bis April. Die Equine Endocrinology Group (SCHOTT et al. 2017) empfiehlt eine Durchführung des TRH-Stimulationstests von Mitte November bis Mitte Juli, da es für die Herbstmonate noch keine validierten Referenzwerte gibt. In der Studie von BEECH et al. (2007) waren die Auswirkungen der Jahreszeit auf den TRH-Stimulationstest noch nicht ausreichend untersucht worden. Da der Test den Autoren nach aber Ende Juli durchgeführt wurde, ist eine Beeinflussung durch die kürzer werdende Tageslänge möglich. In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben für die Kontrolluntersuchung des oben genannten Pferdes Mitte Juli entnommen. Die Untersuchung während des Schmerzzustandes erfolgte Anfang Juli. Genau wie der ACTH 30-Wert lag bei diesem Pferd auch der ACTH-Basalwert während der Kontrolluntersuchung geringgradig höher als während der Schmerzen. Es ist daher möglich, dass die Ergebnisse hier ebenfalls durch die Jahreszeit beeinflusst wurden, trotz Einhaltung der aktuellen Empfehlungen der Equine Endocrinology Group. In Widerspruch dazu steht jedoch, dass bei einem anderen Pferd die Kontrolluntersuchung ebenfalls Mitte Juli durchgeführt wurde. Dieses Pferd zeigte dabei einen auffällig niedrigen ACTH 30-Wert von 5,5 pg/ml. Auch eine beginnende subklinische PPID-Erkrankung könnte die Ursache für den positiven TRH-Stimulationstest des oben genannten Pferdes gewesen sein. Bei einer subklinischen PPID fehlen die typischen Symptome und die Pferde weisen zum Teil einen normalen ACTH-Basalwert auf (BEECH et al. 2007). Da die Kontrolluntersuchung aber nur 8 Tage nach den Schmerzproben durchgeführt wurde, ist es unwahrscheinlich, dass sich in dieser Zeit eine PPID entwickelt hat. Vor dem Hintergrund, dass Schmerz zu einer eventuellen Beeinflussung des TRH-Stimulationstests führt, aufgrund einer abgeschwächten Reaktion der Hypophyse auf TRH, könnte man die Hypothese aufstellen, dass das Pferd schon zuvor an einer subklinischen PPID litt, das TRH jedoch durch den vorhandenen Schmerz nicht vollständig an der Hypophyse wirken konnte. Leider konnte bei diesem Pferd kein weiterer TRH-Stimulationstest durchgeführt werden, um eine eventuelle PPID zu bestätigen.

Wie auch für den ACTH-Basalwert, konnte für das stimulierte ACTH weder ein Unterschied zwischen gering- und mittelgradigen Schmerzen noch ein Einfluss der Schmerzintensität auf die Höhe von ACTH 30 festgestellt werden. Auch zwischen den verschiedenen Krankheitsgruppen gab es keinen signifikanten Unterschied.

### **5.2.5. Kortisol**

Gering- bis mittelgradige Schmerzen führten zu keinem signifikanten Anstieg von Kortisol. Dazu konnte weder ein Einfluss der Schmerzintensität auf Kortisol noch ein Unterschied

zwischen Pferden mit gering- und mittelgradigen Schmerzen festgestellt werden.

Auch RAEKALLIO et al. (1997b) und RIETMANN et al. (2004a) konnten keine Korrelation der Kortisolkonzentrationen mit der Schmerzintensität bei Pferden nach orthopädischer Operation oder bei Pferden mit Hufrehe nachweisen. In einer weiteren Studie korrelierte Kortisol ebenfalls nicht mit postoperativen Schmerzen nach Arthroskopie (RAEKALLIO et al. 1997a). Hunde mit traumatischen Knochenfrakturen hatten sogar signifikant niedrigere Kortisolwerte im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren (SRITHUNYARAT et al. 2017). Dagegen beschrieben PRITCHETT et al. (2003) signifikant erhöhte Kortisolkonzentrationen bei Pferden mit postoperativen Schmerzen nach Laparotomie. Auch Pferde mit akuter Hufrehe wiesen signifikant erhöhte Kortisolwerte auf (HOOD 1999). BUSSIÈRES et al. (2008) und MAY (2007) konnten sogar eine positive Korrelation zwischen Kortisol und der Schmerzintensität darstellen. Auch Hunde mit experimentell induzierter Synovialitis und Schaflämmer nach der Kastration hatten signifikant erhöhte Kortisolkonzentrationen (MELLOR et al. 1991, FELDSEIN et al. 2010).

Es ist wahrscheinlich, dass die Stärke der Kortisolsekretion von der Intensität des Schmerzes abhängt. In der vorliegenden Studie litten die Pferde an gering- bis mittelgradigen Schmerzen. Es wurde beschrieben, dass Kortisol jedoch nur bei hochgradigem Schmerz signifikant ansteigt (TENNANT 2012). Auch RAEKALLIO et al. (1997a) merkten an, dass in ihrer Studie die Schmerzen nach einer Arthroskopie eventuell nicht stark genug waren, um die Kortisolkonzentrationen signifikant zu erhöhen. Dagegen untersuchten PRITCHETT et al. (2003) Pferde nach Laparotomie und BUSSIÈRES et al. (2008) Pferde mit akuter Synovialitis, die mit einem stärkeren Maß an Schmerzen einhergegangen sein könnten. Auch NIINISTÖ et al. (2010) konnten nur bei Pferden mit hochgradiger Koliksymptomatik signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren messen, nicht aber bei solchen mit gering- oder mittelgradiger Kolik. Da die Schmerzintensitäten in den jeweiligen Studien aber immer auf unterschiedliche Weise evaluiert wurden, ist ein direkter Vergleich schwierig.

Um zu prüfen, ob die Art des Schmerzes einen Einfluss auf die Kortisolsekretion hatte, wurden in der vorliegenden Arbeit auch Pferde mit verschiedenen Erkrankungen verglichen. Dabei lag der p-Wert, beim Vergleich zwischen den verschiedenen Krankheitsgruppen, mit 0,052 nur knapp über dem Signifikanzniveau von 0,05. Die Pferde mit Kolik wiesen die höchsten Kortisolwerte auf (Median 96,3 ng/ml), danach folgten die Pferde mit Hufrehe (Median 44 ng/ml) und die orthopädischen Patienten (Median 27 ng/ml). Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Herkunft des Schmerzes die Sekretion von Kortisol beeinflussen kann. Auch AYALA et al. (2012) untersuchten die Kortisolkonzentrationen bei Pferden mit

verschiedenen Erkrankungen. Dabei hatten Pferde mit Kolik, Hufrehe oder akuten Erkrankungen wie einem Trauma höhere Werte als solche mit chronischen Erkrankungen wie Arthrose. Auch in anderen Studien hatten Pferde mit Kolik erhöhte Kortisolwerte. Dabei war die Höhe der Konzentrationen mit der Schwere der Kolik assoziiert (HINCHCLIFF et al. 2005, NIINISTÖ et al. 2010, TOWNS et al. 2010, MAIR et al. 2014). Pferde mit postoperativen Schmerzen nach einer orthopädischen Operation wiesen dagegen keinen signifikanten Anstieg von Kortisol auf (RAEKALLIO et al. 1997b). Die in der vorliegenden Arbeit höchsten Werte bei Kolikern könnten mit der Tatsache erklärt werden, dass diese an den stärksten Schmerzen litten. Einer der Koliker wies mit 56 % tatsächlich die höchste Schmerzintensität unter den schmerzbelasteten Pferden auf. Der andere litt mit 33 % jedoch nur an geringgradigen Schmerzen. Eine andere Erklärung könnten die oft mit einer Kolik einhergehende Endotoxämie oder die kardiovaskulären Störungen sein, die neben dem Schmerz zusätzliche Stressoren darstellen, die die HHN-Achse aktivieren (MAIR et al. 2014).

In der vorliegenden Studie wurde bei zwei Pferden während des Schmerzzustandes ein niedrigerer Kortisolwert als bei der Kontrolluntersuchung gemessen. Dabei könnte, wie zuvor erwähnt, die Dauer des Schmerzes eine Rolle gespielt haben. Ob es bei chronischem Schmerz zu einem Anstieg oder einem Abfall von Kortisol kommt, wird in der Literatur widersprüchlich beantwortet (STRITTMATTER et al. 2005, DICKENS and ROMERO 2013). Schafe mit chronischer Fußfäule hatten nach einer Woche erniedrigte, nach 4 Wochen jedoch erhöhte Kortisolwerte (LEY et al. 1991, LEY et al. 1994). Untersuchungen an Pferden mit länger andauernden Schmerzen ergaben meist erniedrigte Kortisolkonzentrationen. Bei Pferden mit experimentell induzierter Lahmheit stieg das Kortisol zwar zunächst signifikant an, sank dann aber innerhalb weniger Stunden wieder ab, obwohl die Lahmheit bestehen blieb (FOREMAN et al. 2008). Dies könnte aber zum Teil auch auf den zirkadianen Rhythmus von Kortisol mit niedrigeren Werten am Abend zurückzuführen gewesen sein (IRVINE and ALEXANDER 1994). Die Induktion einer chronischen Entzündung führte bei Pferden zu einem graduellen Absinken der Kortisolkonzentrationen mit den niedrigsten Werten nach 9 Tagen (MILLS et al. 1997). Auch RIETMANN et al. (2004a) vermuteten den Grund für die niedrigen Kortisolwerte bei Pferden mit Hufrehe in der Dauer des Schmerzes. In ihrer Studie bestanden die Schmerzen seit über 16 Stunden, bevor die Messungen durchgeführt wurden. Wie schon zuvor erwähnt, wurde in der vorliegenden Studie jedoch nicht erfasst, wie lange die Pferde schon an Schmerzen litten.

Insgesamt ist die Kortisolantwort individuell sehr unterschiedlich und kann von vielen Faktoren beeinflusst werden (IRVINE and ALEXANDER 1994, HART 2012, MAIR et al. 2014). In der vorliegenden Studie wurden die Messungen immer zweimal am gleichen Tier, zur gleichen

Tageszeit, vom gleichen Untersucher und, wenn möglich, in der gleichen Umgebung durchgeführt, um viele Einflussfaktoren auf Kortisol zu minimieren. Doch es ist wahrscheinlich, dass die Art, die Intensität und die Zeitdauer der Schmerzen, die bei jedem Pferd unterschiedlich waren, sowie die verschiedenen mit dem Schmerz vergesellschafteten Erkrankungen die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit beeinflusst haben. Dadurch ist es schwer, den Einfluss von Schmerz auf die Kortisolsekretion zu interpretieren.

### **5.2.6. Kortisol nach TRH-Stimulation**

Früher wurde bei der Durchführung des TRH-Stimulationstests zur PPID-Diagnostik Kortisol statt ACTH gemessen, auch aufgrund eines fehlenden kommerziell erhältlichen Tests für das ACTH des Pferdes (BEECH and GARCIA 1985). Untersuchungen zeigten aber, dass die Messung von ACTH zur Unterscheidung von kranken und gesunden Tieren dem Kortisol überlegen ist. Bei Pferden mit PPID kam es nach TRH-Stimulation zwar zu einem signifikanten Anstieg der Kortisolkonzentrationen, die stimulierten Kortisolwerte unterschieden sich im Gegensatz zu ACTH jedoch nicht zwischen Gesunden und solchen mit PPID (EILER et al. 1997, MCFARLANE et al. 2006, BEECH et al. 2011a). Heutzutage wird für den TRH-Stimulationstest nur noch die Messung von ACTH empfohlen (SCHOTT et al. 2017).

In der vorliegenden Studie kam es 30 Minuten nach der intravenösen Applikation von TRH zu einem signifikanten Anstieg der Kortisolkonzentrationen. Dies war während des Schmerzzustandes und der Kontrolluntersuchung der Fall. Bei vier der an Schmerzen leidenden Pferde sank jedoch das Kortisol nach TRH-Stimulation. Drei dieser vier Pferde wiesen auch erniedrigte ACTH-Werte nach der Applikation von TRH auf. TRH stimuliert die ACTH-Ausschüttung aus der Hypophyse, das ACTH wiederum bewirkt die Sekretion von Kortisol aus der Nebennierenrinde, womit sich die parallel gesunkenen Werte erklären lassen (MCFARLANE et al. 2006). Bei einem Pferd kam es auch während der Kontrolluntersuchung zu einem Absinken von Kortisol nach TRH-Stimulation. Diese Ergebnisse spiegeln die auch in anderen Studien beobachteten, unterschiedlichen Reaktionen des Kortisols auf TRH wider. Dabei kam es bei Pferden ohne PPID entweder zu einem signifikanten Anstieg (MCFARLANE et al. 2006) oder die Konzentrationen blieben annähernd gleich (BEECH and GARCIA 1985, EILER et al. 1997, BEECH et al. 2011a).

Es konnte kein signifikanter Unterschied der Kortisol 30-Werte zwischen dem Schmerzzustand und der Kontrolluntersuchung festgestellt werden. Trotz fehlender Signifikanz kam es bei Schmerzen in der deskriptiven Statistik aber zu einer Erhöhung von Kortisol 30, im Gegensatz

zu ACTH 30, dessen Werte während des Schmerzzustandes geringer waren als bei der Kontrolle. Das durch TRH stimulierte Kortisol schien sich also nicht synchron zum stimulierten ACTH zu verhalten. Solch eine fehlende Assoziation von immunreaktivem ACTH und den Kortisolkonzentrationen wurde unter anderem bei gesunden Menschen (POLAND et al. 1989), bei kritisch kranken Menschen (PEETERS et al. 2017), bei Hunden nach akutem Blutverlust (DEMPSHER and GANN 1983) und bei Pferden mit PPID beschrieben (BEECH et al. 2011a). Als mögliche Ursachen wurden das Verhältnis von biologisch aktivem und immunreaktivem ACTH, eine veränderte Sensitivität der Nebenniere auf ACTH oder ein verminderter Abbau von Kortisol diskutiert (DEMPSHER and GANN 1983, POLAND et al. 1989, BEECH et al. 2011a, PEETERS et al. 2017). BEECH et al. (2011a) berichteten hingegen von einem signifikanten Zusammenhang der ACTH- und Kortisolwerte bei gesunden Pferden nach TRH-Stimulation. Ob solch ein Zusammenhang auch in der vorliegenden Studie vorlag, wurde jedoch nicht getestet. Dafür wären mehrfache Messungen jedes Pferdes in gleichen Zeitabständen nötig gewesen.

Die Schmerzintensität hatte in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf die Höhe von Kortisol 30. Einen signifikanten Unterschied zwischen gering- und mittelgradigen Schmerzen gab es somit ebenfalls nicht. Beim Vergleich der verschiedenen Krankheitsgruppen wiesen die Koliker zwar die höchsten Werte auf, dies war aber nicht signifikant.

### **5.2.7. Herzfrequenzvariabilität**

Bei der HFV von Pferden scheint es große interindividuelle Unterschiede zu geben, was auch in der vorliegenden Studie zu beobachten war (VON BORELL et al. 2007, SCHMIDT et al. 2010). Vergleiche der HFV während und nach einem Zustand wie Schmerz sollten daher immer am gleichen Tier erfolgen und nicht zwischen unterschiedlichen Gruppen (VON BORELL et al. 2007, HALMER et al. 2014). Dies wurde in der vorliegenden Studie berücksichtigt.

Während des Schmerzzustandes kam es zwar zu keinen signifikanten Veränderungen der LF- oder der HF-Komponente, die LF/HF-Ratio war dagegen signifikant erhöht ( $p = 0,028$ ). Trotz fehlender Signifikanz konnte in der deskriptiven Statistik zum Zeitpunkt des Schmerzes ein leichter Anstieg der LF-Leistung und gleichzeitig ein leichter Abfall der HF-Leistung beobachtet werden. Diese Veränderungen spiegeln die Stressreaktion des autonomen Nervensystems auf den Schmerz wider (RIETMANN et al. 2004a). Schmerz führt zu einer Stressantwort im Körper, infolgedessen es unter anderem zu einer Aktivierung des sympathischen

Nervensystems kommt (MUIR and WOOLF 2001, GUNNAR and QUEVEDO 2007). Die HF-Komponente der HFV wird dem Parasympathikus zugeschrieben, die LF-Komponente wird sowohl vom Parasympathikus als auch vom Sympathikus beeinflusst. Die LF/HF-Ratio dient daher zur Beurteilung der sympathovagalen Balance (KUWAHARA et al. 1996, LOMBARDI et al. 1996, OHMURA et al. 2001). Die in der vorliegenden Studie während des Schmerzzustandes beobachtete Erhöhung der LF-, Erniedrigung der HF-Leistung sowie die signifikant erhöhte LF/HF-Ratio deuten demnach auf eine Verschiebung des autonomen Tonus in Richtung sympathischer Dominanz hin. Dies deckt sich mit Ergebnissen von RIETMANN et al. (2004a). In ihrer Studie hatten Pferde mit Hufrehe, die kein NSAID erhielten und somit auch einen höheren Schmerzindex aufwiesen, eine höhere LF- und eine niedrigere HF-Leistung sowie eine erhöhte LF/HF-Ratio als Pferde mit Analgesie und geringeren Schmerzen. Doch auch hier waren die Unterschiede nicht signifikant. Als Grund für die fehlende Signifikanz benannten die Autoren die hohe Variabilität ihrer Daten, was auch für die vorliegende Studie zutreffen könnte. Zu gleichartigen Veränderungen der frequenzbezogenen Parameter der HFV führte auch die chirurgische Manipulation unter Allgemeinanästhesie bei Pferden und die Enthornung ohne Lokalanästhesie bei Kälbern (OEL et al. 2006, STEWART et al. 2008).

Während der Kontrolluntersuchung sank die LF-Komponente, während die HF-Komponente anstieg und nun überwog. Dies war zu erwarten, da in Ruhe der Parasympathikus vorherrscht (VON BORELL et al. 2007).

Zwischen den verschiedenen Schmerzintensitäten der Schmerzgruppen 1 und 2 konnte hingegen kein signifikanter Unterschied bezüglich LF, HF oder der LF/HF-Ratio festgestellt werden. Obwohl die LF/HF-Ratio in der Schmerzgruppe 1 (Median 1,77) deutlich höher lag als in der Schmerzgruppe 2 (Median 0,36), war dieser Unterschied nicht signifikant. Dies könnte auf die hohe Variabilität der erhobenen Daten aufgrund der benannten individuellen Unterschiede der HFV zurückzuführen sein. Die beiden Schmerzgruppen wiesen zusätzlich unterschiedliche Gruppengrößen auf. Auch wäre eine Signifikanz der Ergebnisse widersprüchlich zu der beobachteten Erhöhung der LF/HF-Ratio bei Schmerz gewesen, da es so bei den Pferden mit geringgradigen Schmerzen zu einer stärkeren Sympathikusaktivierung gekommen wäre als bei Pferden mit mittelgradigen Schmerzen.

Zwischen den verschiedenen Krankheitsgruppen gab es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

Auch eine Korrelation der frequenzbezogenen Parameter mit der Schmerzintensität konnte nicht festgestellt werden. Dagegen ermittelten RIETMANN et al. (2004a) eine moderate Korrelation von LF, HF und der LF/HF-Ratio mit einem Schmerzindex. In einer anderen Untersuchung an Pferden mit Hufrehe korrelierte der RMSSD (root mean square of successive RR differences), der aus 100 Datenpunkten errechnet wurde, negativ mit dem Obel Grad. Mit dem RMSSD erfolgt eine Schätzung der hochfrequenten Schwankungen zwischen den Herzschlägen und damit der vagalen Aktivität (VON BORELL et al. 2007). Dagegen ergab die Errechnung des RMSSD aus 500 Datenpunkten keine Korrelation (HALMER et al. 2014). Beim Menschen gab es ebenfalls keine Korrelation von zeit- oder frequenzbezogenen Parametern mit der Schmerzintensität, die durch einen Hitzestimulus ausgelöst wurde (MEEUSE et al. 2013).

Ein Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den oben aufgeführten Studien ist kritisch zu betrachten, da die Datenerfassung und die Auswertung stets unterschiedlich erfolgten. So verwendeten RIETMANN et al. (2004a) zur Spektralanalyse ein autoregressives Modell, anstatt der Fast Fourier Transformation. HALMER et al. (2014) errechneten nur einen zeitbezogenen Parameter, während die Berechnungen bei MEEUSE et al. (2013) an einer anderen Spezies erfolgten. Für das Pferd fehlt derzeit eine standardisierte Methode für die Analyse der HFV. Die Interpretation der erhobenen Daten sollte daher mit Vorsicht erfolgen (MUNSTERS et al. 2013, HALMER et al. 2014).

#### **5.2.8. Fälle außerhalb der Statistik**

In der vorliegenden Studie wurde ein Pferd wegen extremer Werte aus den Berechnungen ausgeschlossen. Dieses Pferd litt an einer Kolik und wies eine Schmerzintensität von 60,6 % auf. Damit litt es als einziges Tier an hochgradigen Schmerzen. Das Pferd hatte eine Herzfrequenz von 84 Schlägen/Minute und eine Atemfrequenz von 36 Zügen/Minute, die innere Körpertemperatur konnte nicht gemessen werden. Es wurde zum Zeitpunkt der Probenentnahme mit Ringerlösung, Glukose und Lidocain infundiert. Bei diesem Pferd wurde eine basale ACTH-Konzentration von 139 pg/ml und einen Kortisolwert von 180 ng/ml gemessen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von NIINISTÖ et al. (2010) und TOWNS et al. (2010), wonach eine hochgradige Kolik zu signifikant erhöhten ACTH-Werten führt. Auch das Kortisol lag über dem Referenzbereich von 30 – 130 ng/ml. Nach TRH-Stimulation stieg die ACTH-Konzentration auf 192 pg/ml und der Kortisolwert auf 210 ng/ml an. Der TRH-Stimulationstest wurde also anscheinend nicht negativ vom Schmerz beeinflusst. Von diesem Pferd konnte wegen der hochgradigen Koliksymptomatik kein artefaktfreies EKG

aufgezeichnet werden. Da es aufgrund seiner Erkrankung im Verlauf der Studie euthanasiert werden musste, war auch keine Kontrolluntersuchung möglich. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass eine Messung des ACTH-Wertes zur PPID-Diagnostik nicht bei Pferden mit hochgradiger Schmerzsymptomatik und hochgradig gestörtem Allgemeinbefinden durchgeführt werden sollte.

Das zweite Pferd, welches nicht in die Studie integriert wurde, war ein 15-jähriges Pony und entwickelte im Verlauf klinische Anzeichen auf eine PPID. Es zeigte eine geringgradige Hypertrichose sowie die Anzeichen eines Senkrückens mit Pendelabdomen. Grund für die Vorstellung in der Pferdeklinik war eine Hufreheerkrankung und es litt an mittelgradigen Schmerzen mit einer Schmerzintensität von 52 %. Während des Schmerzzustandes lag der ACTH 0-Wert mit 17,2 pg/ml im Referenzbereich. Das ACTH nach dem TRH-Stimulationstest war jedoch erhöht, mit 41,7 pg/ml. Bei diesem Pferd wurden zwei Nachuntersuchungen durchgeführt, nachdem es wieder schmerzfrei war. Bei der ersten Kontrolluntersuchung Ende Juni lag der ACTH 0-Wert bei 32,6 pg/ml, der ACTH 30-Wert bei 81,5 pg/ml. Die zweite Kontrolluntersuchung Mitte Juli ergab einen ACTH-Basalwert von 37,6 pg/ml und einen ACTH 30-Wert von 94,4 pg/ml. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass das Pony eine PPID entwickelte, da der TRH-Stimulationstest konstant über dem Referenzbereich lag. Auffallend ist jedoch, dass die ACTH 0- und ACTH 30-Werte während des Schmerzzustandes geringer waren als bei den Kontrolluntersuchungen. Ob die verabreichten NSAIDs während des Schmerzzustandes die ACTH-Konzentrationen gesenkt haben oder die Jahreszeit bei den Kontrolluntersuchungen eventuell schon zu einer gesteigerten ACTH-Sekretion führte, kann aus den Ergebnissen nicht beantwortet werden. Die Parameter der HFV für dieses Pferd sind in Tab. 16 dargestellt. Während des Schmerzzustandes stieg die LF-Komponente an, während die HF-Komponente abfiel. Die HF/LF-Ratio war zum Zeitpunkt der Schmerzen höher. Eine Kontrollmessung erfolgte hier nur einmal. All diese Veränderungen weisen auf eine verstärkte sympathische Regulation hin, wie es auch bei den anderen Pferden der Studie beobachtet wurde.

**Tab. 16:** Frequenzbezogene Parameter der HFV des Ponys mit Verdacht auf PPID während des Schmerzzustandes und der Kontrolluntersuchung.

Parameter der HFV	Schmerzen	Kontrolle
LF (n.u.)	64,2	50,9
HF (n.u.)	35,8	49,1
LF/HF	1,79	1,04

### 5.3. Beantwortung der Fragen aus der Einleitung

- Führen Schmerzen zu einem signifikanten Anstieg des ACTH-Wertes im Blut, sodass es zu einem falsch-positiven Ergebnis bei der PPID-Diagnostik schmerzbelasteter Pferde kommen würde?

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie ergeben, dass gering- bis mittelgradige Schmerzen zu keinem signifikanten Anstieg der ACTH-Konzentrationen im Blut führen. Eine Messung des ACTH-Wertes zur PPID-Diagnostik könnte somit bei Pferden mit gering- bis mittelgradigen Schmerzen durchgeführt werden.

- Führen Schmerzen zu einem signifikanten Anstieg des ACTH-Wertes nach TRH-Stimulation, sodass die Durchführung des TRH-Stimulationstests bei schmerzbelasteten Pferden zu einem falsch-positiven Ergebnis bei der PPID-Diagnostik führen würde?

In der vorliegenden Arbeit führten gering- bis mittelgradige Schmerzen zu keinem signifikanten Anstieg der ACTH-Konzentrationen nach TRH-Stimulation. Ein falsch-positives Testergebnis bei der Durchführung des TRH-Stimulationstests zur PPID-Diagnostik ist daher nicht zu erwarten.

- Führen Schmerzen zu einem Anstieg der Kortisolkonzentrationen beim Pferd?

Gering- bis mittelgradige Schmerzen führten zu keinem signifikanten Anstieg der Kortisolkonzentrationen. Auch nach TRH-Stimulation hatten an Schmerzen leidende Pferde keine erhöhten Kortisolkonzentrationen.

- Gibt es einen Unterschied der ACTH- oder Kortisolkonzentrationen bei verschiedenen Schmerzintensitäten?

Es konnte kein signifikanter Unterschied der ACTH- oder Kortisolkonzentrationen zwischen Pferden mit gering- und mittelgradigen Schmerzen festgestellt werden.

- Hat die Schmerzintensität einen Einfluss auf die Höhe der ACTH- oder Kortisolkonzentrationen?

Die Schmerzintensität hatte in der vorliegenden Arbeit weder einen Einfluss auf die Höhe der ACTH-Werte noch auf die Höhe der Kortisolkonzentrationen.

- Gibt es einen Unterschied der ACTH- oder Kortisolkonzentrationen bei verschiedenen Arten von Schmerz?

Es wurden Pferde mit Kolik, Hufrehe und solche mit einer orthopädischen Erkrankung verglichen. Bezüglich der ACTH-Werte gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Krankheitsgruppen. Das Kortisol lag bei den Pferden mit Kolik am höchsten, danach folgten die Pferde mit Hufrehe. Dieser Unterschied war zwar nicht signifikant, der p-Wert lag mit 0,052 jedoch nur knapp über dem Signifikanzniveau.

- Führen Schmerzen zu Veränderungen der frequenzbezogenen Parameter der Herzfrequenzvariabilität und sind diese zur Beurteilung der Schmerzintensität geeignet?

Schmerz führte zu einer Erhöhung der LF- und Erniedrigung der HF-Komponente sowie zu einer erhöhten LF/HF-Ratio. Diese Veränderungen waren dabei nur für die LF/HF-Ratio signifikant ( $p = 0,028$ ). Eine Korrelation der Parameter mit der Schmerzintensität konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die Analyse der HFV scheint damit nicht geeignet zu sein, die Schmerzintensität zu beurteilen.

## 5.4. Schlussfolgerungen und Ausblick

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie geht hervor, dass gering- bis mittelgradige Schmerzen weder die basalen ACTH- und Kortisolwerte noch den TRH-Stimulationstest wesentlich beeinflussen. Die Messung von ACTH und die Durchführung des TRH-Stimulationstests zur PPID-Diagnostik kann demnach an schmerzbelasteten Pferden erfolgen, solange diese nicht an massiven Schmerzen leiden oder ein erheblich gestörtes Allgemeinbefinden aufweisen, was auf eine schwere systemische Erkrankung hindeuten würde. Die Referenzbereiche für den ACTH-Basalwert und die ACTH-Werte nach TRH-Stimulation sollten sich immer nach dem jeweiligen Labor richten und der Jahreszeit angepasst sein. Weist ein Pferd mit Verdacht auf PPID während eines gering- bis mittelgradigen Schmerzzustandes einen deutlich erhöhten ACTH-Basalwert auf, kann von einer PPID-Erkrankung ausgegangen werden. Ist der ACTH-Wert jedoch nur leicht erhöht, sollte zusätzlich der TRH-Stimulationstest durchgeführt werden. Dabei muss darauf geachtet werden, dass validierte Referenzbereiche bisher nur für die Zeit von Mitte November bis Mitte Juli existieren und der Test nicht im Herbst durchgeführt werden sollte.

Da es für die Beurteilung der Schmerzintensität jedoch noch keinen einheitlichen Goldstandard gibt, sind die Begriffe „geringgradig“ und „mittelgradig“ nicht eindeutig definiert, was diese

Aussage in der Praxis schwer zu interpretieren macht. Die Entwicklung einer allgemein gültigen Schmerzbeurteilungsskala für verschiedene Arten von Schmerz beim Pferd wäre nötig, um die Schmerzintensitäten eindeutig voneinander abgrenzen zu können.

Schmerz ist nicht gleich Schmerz. Weitere Untersuchungen an einer größeren Anzahl von Pferden mit einheitlichen Schmerzmustern wären nötig, um die Einflüsse der Art bzw. Herkunft, der Intensität und der Zeitdauer des Schmerzes auf die Stresshormone noch präziser zu bestimmen. Zwar beschäftigten sich einige Studien mit den Auswirkungen von Schmerz auf die HHN-Achse, dabei wurde aber meist Kortisol gemessen, um herauszufinden, ob sich dieses Hormon zur objektiven Schmerzbeurteilung eignet (PRITCHETT et al. 2003, BUSSIÈRES et al. 2008). Die Reaktion der ACTH-Sekretion des Pferdes auf Schmerz bedarf weiterer Forschung.

Zudem fehlen bisher weitere Untersuchungen zu den Auswirkungen von Schmerz auf den TRH-Stimulationstest. Daher wäre eine Wiederholung dieser Studie mit einer größeren Anzahl an Pferden mit gleichartigen Schmerzen hilfreich. Auch die Auswirkungen von Medikamenten auf den TRH-Stimulationstest könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. So wäre es sinnvoll, die Einflüsse von NSAIDs zu bestimmen, da gerade Hufrehepatienten, bei denen eine PPID-Diagnostik oft nötig sein kann, solche Medikamente erhalten. Eine Studie an Hufrehepatienten mit einem TRH-Stimulationstest vor und nach der Gabe eines NSAIDs sowie einer Kontrolluntersuchung, wenn die Pferde wieder schmerzfrei sind, wäre denkbar.

Zur objektiven Schmerzbeurteilung scheint die Messung der Herzfrequenzvariabilität nur bedingt geeignet zu sein. Zwar kam es in der vorliegenden Studie zu Veränderungen der LF- und HF-Komponente, die auf eine Sympathikusaktivierung hindeuten, diese korrelierten aber nicht mit der Schmerzintensität und ließen somit keine Aussage über die Stärke der Schmerzen zu. Auch die individuellen Unterschiede der HFV beim Pferd, wie in anderen Studien beschrieben und auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet, führen zu fehlenden Referenzwerten. Dies macht es schwierig, die HFV als Parameter für die objektive Schmerzbeurteilung zu verwenden (VOSS et al. 2002, VON BORELL et al. 2007). Eine allgemein gültige Methode zur Analyse der HFV beim Pferd ist nötig, um ihren potenziellen Nutzen für die Schmerzmessung besser beurteilen zu können.

Da auch die Auswirkungen verschiedener Medikamente und auch des TRHs auf die HFV nicht genau bekannt sind, sollten zukünftige Untersuchungen an schmerzbelasteten Pferden beim ersten Auftreten von Schmerzsymptomen und vor der Applikation von Medikamenten erfolgen, solange dies unter Tierschutzaspekten möglich ist.

## 6. Zusammenfassung

### **ACTH-Messungen bei verschiedenen Schmerzzuständen des Pferdes**

Schmerz verursacht Stress und führt unter anderem zur Ausschüttung von Stresshormonen sowie zur Aktivierung des sympathischen Nervensystems. Um Schmerzen beim Pferd in ihrer Art und Intensität beurteilen zu können, wird das Verhalten beobachtet, klinische Parameter wie die Herzfrequenz gemessen und oft auch die Blutkonzentrationen von ACTH und/oder Kortisol bestimmt. Für eine möglichst objektive Schmerzevaluierung werden immer neue Methoden getestet. Dabei wird auch die Analyse der Herzfrequenzvariabilität (HFV), die eine nicht-invasive Methode zur Erfassung der Aktivität des autonomen Nervensystems darstellt, als Schmerzparameter diskutiert.

Die Pituitary Pars Intermedia Dysfunction (PPID) ist eine endokrine Erkrankung älterer Pferde und Ponys. Durch eine Hyperplasie der Pars intermedia der Hypophyse kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung ihrer Hormone, darunter auch von ACTH. Die Diagnose erfolgt anhand der Messung des basalen ACTH-Wertes oder des TRH-Stimulationstests, bei dem die ACTH-Ausschüttung durch TRH stimuliert wird. Da Schmerz ebenfalls zu einer Sekretion von ACTH führen kann, herrscht unter Tierärzten oft Unsicherheit, ob ein Pferd auf PPID getestet werden kann, wenn dieses an einer schmerzhaften Erkrankung wie z.B. Hufrehe leidet. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Auswirkungen verschiedener Intensitäten und Arten von Schmerz auf die basalen ACTH- und Kortisolwerte sowie den TRH-Stimulationstest bei Pferden ohne PPID zu bestimmen. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob Schmerzen zu einer starken Erhöhung der ACTH-Werte führen, sodass es zu einem falsch-positiven Ergebnis bei der PPID-Diagnostik kommen würde. Zusätzlich wurde geprüft, ob sich die Analyse der Herzfrequenzvariabilität (HFV) zur Schmerzbeurteilung eignet.

Untersucht wurden 15 schmerzbelastete Pferde, die als ihre eigenen Kontrollen dienten, sobald sie wieder schmerzfrei waren. Die Pferde wurden nach ihrer Erkrankung in drei Krankheitsgruppen eingeteilt (Krankheitsgruppe 1 = Kolik, Krankheitsgruppe 2 = Hufrehe, Krankheitsgruppe 3 = orthopädische Erkrankung). Die Beurteilung der Schmerzintensität wurde anhand einer zusammengesetzten Schmerzskala durchgeführt, die einen allgemeinen Teil sowie spezifische Parameter für die jeweilige Erkrankung enthielt. Im Anschluss erfolgte die Messung von ACTH und Kortisol, vor und nach der intravenösen Applikation von 1 mg TRH. Aus einem angefertigten Kurzzeit-EKG wurden 2-minütige Sequenzen zur frequenzbezogenen Analyse der HFV herausgeschnitten. Mithilfe einer Spektralanalyse wurden die niederfrequente Komponente (low frequency, LF) und die hochfrequente

Komponente (high frequency, HF) sowie der Quotient aus LF und HF (LF/HF-Ratio) berechnet. Für alle gemessenen Parameter erfolgte ein Vergleich zwischen Schmerzzustand und Kontrolluntersuchung sowie zwischen verschiedenen Schmerzintensitäten und Krankheitsgruppen. Zudem wurde ein eventueller Einfluss der Schmerzintensität auf die Höhe der verschiedenen gemessenen Werte evaluiert.

Die Pferde wiesen gering- bis mittelgradige Schmerzintensitäten auf. Diese führten weder zu einem signifikanten Anstieg der basalen ACTH- und Kortisolkonzentrationen, noch zu einer Beeinflussung des TRH-Stimulationstests. In der deskriptiven Statistik zeigte sich jedoch, dass Schmerz die Wirkung des TRHs auf die ACTH-Ausschüttung tendenziell vermindert. Zwischen den verschiedenen Schmerzintensitäten konnten bezüglich der ACTH- und Kortisolwerte keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Schmerzintensität hatte somit auch keinen Einfluss auf die Höhe der Stresshormone. Zwischen den verschiedenen Krankheitsgruppen gab es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen ACTH und Kortisol. Lediglich die bei den Pferden mit Kolik im Vergleich zu den anderen Krankheitsgruppen am höchsten gemessenen Kortisol-Basalwerte, erreichten beinahe Signifikanzniveau ( $p = 0,052$ ). Bezüglich der Parameter der HFV lag nur die LF/HF-Ratio während des Schmerzzustand signifikant höher als bei der Kontrolluntersuchung ( $p = 0,028$ ). Dies deutet auf eine durch den Schmerz verstärkte Sympathikusaktivität hin. Unterschiede zwischen verschiedenen Schmerzintensitäten oder zwischen den Krankheitsgruppen konnten jedoch für keinen der frequenzbezogenen Parameter festgestellt werden. Auch gab es keine Korrelation mit der Schmerzintensität.

Eine Messung des ACTH-Basalwertes und die Durchführung des TRH-Stimulationstests zur PPID-Diagnostik ist somit bei Pferden mit gering- bis mittelgradigen Schmerzen möglich. Dabei sollten die je nach Labor und Jahreszeit variierenden Referenzwerte beachtet werden. Daneben scheint die frequenzbezogene Analyse der HFV beim Pferd kein geeigneter Parameter zur Beurteilung der Schmerzintensität zu sein.

Limitationen der Studie waren im Wesentlichen die geringe Patientenzahl und die nicht bekannten Auswirkungen der verschiedenen, aufgrund der Grunderkrankung verabreichten Medikamente auf die basalen und stimulierten Stresshormone sowie die HFV. Weitere Untersuchungen an einer größeren Anzahl von schmerzbelasteten Pferden ohne vorherige Medikation wären sinnvoll, wenn dies mit dem Wohl der Tiere vereinbar ist. Zudem war dies die erste Studie zu den Auswirkungen von Schmerz auf den TRH-Stimulationstest. Dies sollte weiterhin Gegenstand der Forschung sein. Daneben ist die Etablierung einer standardisierten Methode zur Analyse der HFV beim Pferd nötig, um ihren potenziellen Nutzen in der

Schmerzbeurteilung besser evaluieren zu können.

## 7. Summary

### Measurements of ACTH in horses with different pain states

Pain causes stress, which leads to the secretion of stress hormones, as well as to the activation of the sympathetic nervous system. To evaluate the type and intensity of pain in horses one observes behavior, measures clinical parameters like heart rate, and often also determines blood concentrations of ACTH and/or cortisol. There is an ongoing effort to find new ways for an objective pain assessment. Analysis of the heart rate variability (HRV) is a non-invasive method to acquire information about the activity of the autonomous nervous system. It is therefore discussed as a parameter for pain assessment.

The pituitary pars intermedia dysfunction (PPID) is an endocrine disease of aged horses and ponies. A hyperplasia of the pituitary's pars intermedia leads to an increased secretion of its hormones, including ACTH. The main tests for diagnosis of PPID are the measurement of basal ACTH and the TRH-stimulation test, where TRH stimulates the secretion of ACTH. Since pain can also lead to elevated concentrations of ACTH, veterinarians are often unsure, whether horses with a painful condition like laminitis can be tested for PPID. The aim of the present study was to evaluate the effects of different intensities and types of pain on the basal concentrations of ACTH and cortisol, as well as the TRH-stimulation test, in horses without PPID. We attempted to answer the question, if pain caused a marked increase of ACTH, which would lead to a false positive result in the diagnosis of PPID. We additionally examined, if the analysis of the HRV was suitable for pain assessment.

15 horses with pain were part of the study. They served as their own controls, as soon as they were pain-free again. The horses were divided into three disease groups, depending on their underlying disease (disease group 1 = colic, disease group 2 = laminitis, disease group 3 = orthopedic problem). A composite pain scale was used to evaluate the intensity of pain. This pain scale contained a general part, as well as specific criteria for every disease. Subsequently, ACTH and cortisol were measured before and after the intravenous application of 1 mg of TRH. From a short-term ECG recording, sequences of two minutes length were used for the frequency domain analysis of the HRV. Using a spectral analysis, the low frequency (LF) and high frequency (HF) domain, as well as the LF/HF-ratio were calculated. All parameters measured during pain were compared to controls and between different pain intensities and disease groups. In addition, a possible influence of different pain intensities on the measured values was evaluated.

Horses had low to moderate pain intensities. Those neither led to a significant increase in basal concentrations of ACTH and cortisol, nor did they have an influence on the TRH-stimulation test. Descriptive statistics however revealed that pain might decrease the effect of TRH on the ACTH-secretion. There were no significant differences between different pain intensities, thus pain intensity had no influence on levels of stress hormones. The disease groups showed no differences, either. Although horses with colic had the highest cortisol concentrations compared to the other disease groups, it only almost reached significance ( $p = 0,052$ ). Regarding the parameters of the HRV, only the LF/HF-ratio was significantly higher in horses with pain ( $p = 0,028$ ). This is indicative of an increased sympathetic activity because of pain. There were no significant differences between pain intensities or disease groups. A correlation of the HRV with the pain intensity was not evident, either.

Thus, measuring the basal ACTH concentration, as well as performing the TRH-stimulation test for the diagnosis of PPID seem to be possible in horses with low to moderate pain. Varying reference values depending on different laboratories and season should be considered. The analysis of HRV, however, does not seem to be a suitable parameter for pain assessment.

One of the main limitations of the present study was the small number of patients. Horses were further given different drugs because of their underlying disease, while the effects on the basal and stimulated concentrations of the stress hormones, as well as the HRV, were unknown. Further studies with a greater number of horses suffering from pain, without previous medication, would be useful, if this was compatible with the well-being of the animal. Furthermore, this was the first study on the effects of pain on the TRH-stimulation test. This should be the subject of further research. Standardized protocols for data collection and analysis of HRV should also be established, in order to better evaluate the relevance for pain assessment.

## 8. Literaturverzeichnis

ABRAMOVICH-SIVAN, S., BITTON, Y., KARIN, J., DAVID, D. and AKSELROD, S. (1996). "The effects of lidocaine on cardiac parasympathetic control in normal subjects and in subjects after myocardial infarction." Clinical Autonomic Research **6**(6): 313-319.

AGUILERA, G. (1994). "Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress." Frontiers in Neuroendocrinology **15**(4): 321-350.

AHOLA KOHUT, S., PILLAI RIDDELL, R., FLORA, D. B. and OSTER, H. (2012). "A longitudinal analysis of the development of infant facial expressions in response to acute pain: immediate and regulatory expressions." Pain **153**(12): 2458-2465.

AKSELROD, S., GORDON, D., UBEL, F. A., SHANNON, D. C., BERGER, A. C. and COHEN, R. J. (1981). "Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control." Science **213**(4504): 220-222.

ALEXANDER, S. L. and IRVINE, C. H. (1995). "The effect of naloxone administration on the secretion of corticotropin-releasing hormone, arginine vasopressin, and adrenocorticotropin in unperturbed horses." Endocrinology **136**(11): 5139-5147.

ALEXANDER, S. L., IRVINE, C. H., ELLIS, M. J. and DONALD, R. A. (1991). "The effect of acute exercise on the secretion of corticotropin-releasing factor, arginine vasopressin, and adrenocorticotropin as measured in pituitary venous blood from the horse." Endocrinology **128**(1): 65-72.

ALEXANDER, S. L., IRVINE, C. H. G. and DONALD, R. A. (1996). "Dynamics of the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis determined using a nonsurgical method for collecting pituitary venous blood from horses." Frontiers in Neuroendocrinology **17**(1): 1-50.

ALOISI, A. M., BUONOCORE, M., MERLO, L., GALANDRA, C., SOTGIU, A., BACCHELLA, L., UNGARETTI, M., DEMARTINI, L. and BONEZZI, C. (2011). "Chronic pain therapy and hypothalamic-pituitary-adrenal axis impairment." Psychoneuroendocrinology **36**(7): 1032-1039.

AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS. (1991). "Lameness exams: evaluating the lame horse." Available at: <https://aaep.org/horsehealth/lameness-exams-evaluating-lame-horse>.

ANTAKLY, T. and EISEN, H. J. (1984). "Immunocytochemical localization of glucocorticoid receptor in target cells." Endocrinology **115**(5): 1984-1989.

ASHLEY, F. H., WATERMAN-PEARSON, A. E. and WHAY, H. R. (2005). "Behavioural assessment of pain in horses and donkeys: Application to clinical practice and future studies." Equine Veterinary Journal **37**(6): 565-575.

- AUPHAN, N., DIDONATO, J. A., ROSETTE, C., HELMBERG, A. and KARIN, M. (1995).  
"Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis."  
Science **270**(5234): 286-290.
- AYALA, I., MARTOS, N. F., SILVAN, G., GUTIERREZ-PANIZO, C., CLAVEL, J. G. and ILLERA, J. C. (2012).  
"Cortisol, adrenocorticotrophic hormone, serotonin, adrenaline and noradrenaline serum concentrations in relation to disease and stress in the horse."  
Research in Veterinary Science **93**(1): 103-107.
- BEECH, J., BOSTON, R. and LINDBORG, S. (2011a).  
"Comparison of cortisol and ACTH responses after administration of thyrotropin releasing hormone in normal horses and those with pituitary pars intermedia dysfunction."  
Journal of Veterinary Internal Medicine **25**(6): 1431-1438.
- BEECH, J., BOSTON, R., LINDBORG, S. and RUSSELL, G. E. (2007).  
"Adrenocorticotropin concentration following administration of thyrotropin-releasing hormone in healthy horses and those with pituitary pars intermedia dysfunction and pituitary gland hyperplasia."  
Journal of the American Veterinary Medical Association **231**(3): 417-426.
- BEECH, J., BOSTON, R. C., MCFARLANE, D. and LINDBORG, S. (2009).  
"Evaluation of plasma ACTH, alpha-melanocyte-stimulating hormone, and insulin concentrations during various photoperiods in clinically normal horses and ponies and those with pituitary pars intermedia dysfunction."  
Journal of the American Veterinary Medical Association **235**(6): 715-722.
- BEECH, J., DONALDSON, M. T. and LINDBORG, S. (2002).  
"Comparison of Vitex agnus castus extract and pergolide in treatment of equine Cushing's syndrome."  
Proceedings of the 48th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners(Orlando, Florida): 175-177.
- BEECH, J. and GARCIA, M. (1985).  
"Hormonal response to thyrotropin-releasing hormone in healthy horses and in horses with pituitary adenoma."  
American Journal of Veterinary Research **46**(9): 1941-1943.
- BEECH, J., MCFARLANE, D., LINDBORG, S., SOJKA, J. E. and BOSTON, R. C. (2011b).  
"alpha-Melanocyte stimulating hormone and adrenocorticotropin concentrations in response to thyrotropin-releasing hormone and comparison with adrenocorticotropin concentration after domperidone administration in healthy horses and horses with pituitary pars intermedia dysfunction."  
Journal of the American Veterinary Medical Association **238**(10): 1305-1315.
- BELYAKOVA, E. I. and MENDZHERITSKII, A. M. (2006).  
"Adrenocortical and thyroid systems of rats during the initial period of nociceptive influences."  
Neuroscience and Behavioral Physiology **36**(5): 561-564.
- BERNTSON, G. G., BIGGER, J. T., JR., ECKBERG, D. L., GROSSMAN, P., KAUFMANN, P. G., MALIK, M., NAGARAJA, H. N., PORGES, S. W., SAUL, J. P., STONE, P. H. and VAN DER MOLEN, M. W. (1997).  
"Heart rate variability: origins, methods, and interpretive caveats."  
Psychophysiology **34**(6): 623-648.

- BOATWRIGHT, C. E., FUBINI, S. L., GROHN, Y. T. and GOOSSENS, L. (1996).  
"A comparison of N-butylscopolammonium bromide and butorphanol tartrate for analgesia using a balloon model of abdominal pain in ponies."  
Canadian Journal of Veterinary Research **60**(1): 65-68.
- VON BORELL, E., LANGBEIN, J., DESPRES, G., HANSEN, S., LETERRIER, C., MARCHANT-FORDE, J., MARCHANT-FORDE, R., MINERO, M., MOHR, E., PRUNIER, A., VALANCE, D. and VEISSIER, I. (2007).  
"Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals: a review."  
Physiology & Behavior **92**(3): 293-316.
- BOSKOVIC, A., BELADA, N. and KNEZEVIC, B. (2014).  
"Prognostic value of heart rate variability in post-infarction patients."  
Vojnosanit Pregl **71**(10): 925-930.
- BOUJON, C. E., BESTETTI, G. E., MEIER, H. P., STRAUB, R., JUNKER, U. and ROSSI, G. L. (1993).  
"Equine pituitary adenoma: a functional and morphological study."  
Journal of Comparative Pathology **109**(2): 163-178.
- BRADARIC, Z. (2012).  
"Untersuchung zum Equinen Cushing Syndrom und Prüfung der Wirksamkeit von Vitex agnus-castus (Mönchspfeffer) bei der Behandlung des Equinen Cushing Syndroms."  
Dissertation med. vet.: Freie Universität Berlin.
- BROWN, M. R. (1981).  
"Thyrotropin releasing factor: a putative CNS regulator of the autonomic nervous system."  
Life Sciences **28**(15-16): 1789-1795.
- BRÜNS, C. (2001).  
"Diagnose und Therapieverlauf des equinen Cushing-Syndroms: Rolle des endogenen ACTH."  
Dissertation med. vet.: Tierärztlichen Hochschule Hannover.
- BUCKINGHAM, J. (1985).  
"Hypothalamo-pituitary responses to trauma."  
British Medical Bulletin **41**(3): 203-211.
- BURNS, T. A. (2016).  
"Effects of Common Equine Endocrine Diseases on Reproduction."  
Veterinary Clinics of North America: Equine Practice **32**(3): 435-449.
- BUSSIÈRES, G., JACQUES, C., LAINAY, O., BEAUCHAMP, G., LEBLOND, A., CADORE, J. L., DESMAIZIERES, L. M., CUVELLIEZ, S. G. and TRONCY, E. (2008).  
"Development of a composite orthopaedic pain scale in horses."  
Research in Veterinary Science **85**(2): 294-306.
- CANNON, W. B. (1929).  
"Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage."  
Digital Book.

CARMALT, J. L., MORTAZAVI, S., MCONIE, R. C., ALLEN, A. L. and UNNIAPPAN, S. (2018). "Profiles of pro-opiomelanocortin and encoded peptides, and their processing enzymes in equine pituitary pars intermedia dysfunction." PLOS ONE **13**(1): 1-11.

CARO, J. F. and AMATRUDA, J. M. (1982). "Glucocorticoid-induced Insulin Resistance: The importance of postbinding events in the regulation of insulin binding, action, and degradation in freshly isolated and primary cultures of rat hepatocytes." The Journal of Clinical Investigation **69**(4): 866-875.

CARREGARO, A. B., FREITAS, G. C., RIBEIRO, M. H., XAVIER, N. V. and DORIA, R. G. (2014). "Physiological and analgesic effects of continuous-rate infusion of morphine, butorphanol, tramadol or methadone in horses with lipopolysaccharide (LPS)-induced carpal synovitis." BMC Veterinary Research **10**: 1-8.

CARREGARO, A. B., NETO, F. J., BEIER, S. L. and LUNA, S. P. (2006). "Cardiopulmonary effects of buprenorphine in horses." American Journal of Veterinary Research **67**(10): 1675-1680.

CARROLL, G. L., MATTHEWS, N. S., HARTSFIELD, S. M., SLATER, M. R., CHAMPNEY, T. H. and ERICKSON, S. W. (1997). "The effect of detomidine and its antagonism with tolazoline on stress-related hormones, metabolites, physiologic responses, and behavior in awake ponies." Veterinary Surgery **26**(1): 69-77.

CARSTENS, E. and MOBERG, G. P. (2000). "Recognizing pain and distress in laboratory animals." Institute for Laboratory Animal Research Journal **41**(2): 62-71.

CHARNEY, D., GRILLON, C. and BREMNER, J. (1998a). "The Neurobiological Basis of Anxiety and Fear: Circuits, Mechanisms, and Neurochemical Interactions (Part I)." The Neuroscientist **4**(1): 35-44.

CHARNEY, D., GRILLON, C. and BREMNER, J. (1998b). "The Neurobiological Basis of Anxiety and Fear: Circuits, Mechanisms, and Neurochemical Interactions (Part II)." The Neuroscientist **4**(2): 122-132.

CHAY, S., WOODS, W. E., NUGENT, T. E., BLAKE, J. W. and TOBIN, T. (1982). "The pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the horse: flunixin meglumine (Banamine)." Equine Practice **4**(10): 16-23.

CHIBA-FALEK, O., LOPEZ, G. J. and NUSSBAUM, R. L. (2006). "Levels of alpha-synuclein mRNA in sporadic Parkinson disease patients." Movement Disorders **21**(10): 1703-1708.

CHUN, M. Y., PARK, H. K., HWANG, H. S., HAN, J. I., CHEE, Y. J. and LEE, J. S. (2011). "The Association between Symptoms of Autonomic Neuropathy and the Heart Rate Variability in Diabetics." Korean Journal of Family Medicine **32**(5): 292-298.

COLAHAN, P. T., BAILEY, J. E., CHOU, C. C., JOHNSON, M., RICE, B. L., JONES, G. L. and CHEEKS, J. P. (2002).

"Effect of flunixin meglumine on selected physiologic and performance parameters of athletically conditioned thoroughbred horses subjected to an incremental exercise stress test." Veterinary Therapeutics **3**(1): 37-48.

COLL, A. M., AMEEN, J. R. and MEAD, D. (2004).

"Postoperative pain assessment tools in day surgery: literature review." Journal of Advanced Nursing **46**(2): 124-133.

COLLINS, S. N., POLLITT, C., WYLIE, C. E. and MATIASEK, K. (2010).

"Laminitic pain: Parallels with pain states in humans and other species." Veterinary Clinics of North America: Equine Practice **26**(3): 643-671.

COOK, V. L. and BLIKSLAGER, A. T. (2008).

"Use of systemically administered lidocaine in horses with gastrointestinal tract disease." Journal of the American Veterinary Medical Association **232**(8): 1144-1148.

COPAS, V. E. and DURHAM, A. E. (2012).

"Circannual variation in plasma adrenocorticotrophic hormone concentrations in the UK in normal horses and ponies, and those with pituitary pars intermedia dysfunction." Equine Veterinary Journal **44**(4): 440-443.

CORDERO, M., BRORSEN, B. W. and MCFARLANE, D. (2012).

"Circadian and circannual rhythms of cortisol, ACTH, and alpha-melanocyte-stimulating hormone in healthy horses." Domestic Animal Endocrinology **43**(4): 317-324.

COTTIN, F., BARREY, E., LOPES, P. and BILLAT, V. (2006).

"Effect of repeated exercise and recovery on heart rate variability in elite trotting horses during high intensity interval training." Equine Veterinary Journal Supplement(36): 204-209.

COUËTIL, L., PARADIS, M. R. and KNOLL, J. (1996).

"Plasma adrenocorticotropin concentration in healthy horses and in horses with clinical signs of hyperadrenocorticism." Journal of Veterinary Internal Medicine **10**(1): 1-6.

COUPLAND, N. J., BAILEY, J. E., GLUE, P. and NUTT, D. J. (1995).

"The cardiovascular and subjective effects of thyrotropin releasing hormone (TRH) and a stable analogue, dimethyl proline-TRH, in healthy volunteers." British Journal of Clinical Pharmacology **40**(3): 223-229.

CREIGHTON, C. M., LEMKE, K. A., LAMONT, L. A., HORNEY, B. S. and DOYLE, A. J. (2012).

"Comparison of the effects of xylazine bolus versus medetomidine constant rate infusion on the stress response, urine production, and anesthetic recovery characteristics in horses anesthetized with isoflurane." Journal of the American Veterinary Medical Association **240**(8): 998-1002.

DAGLISH, J. and MAMA, K. R. (2016).

"Pain: Its Diagnosis and Management in the Rehabilitation of Horses." Veterinary Clinics of North America: Equine Practice **32**(1): 13-29.

DALLA COSTA, E., MINERO, M., LEBELT, D., STUCKE, D., CANALI, E. and LEACH, M. C. (2014).

"Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a pain assessment tool in horses undergoing routine castration."

PLOS One **9**(3): 1-10.

DALLA COSTA, E., STUCKE, D., DAI, F., MINERO, M., LEACH, M. C. and LEBELT, D. (2016).  
"Using the Horse Grimace Scale (HGS) to Assess Pain Associated with Acute Laminitis in Horses (*Equus caballus*)."

Animals **6**(8): 1-9.

DAMMANN, H. G., BETHKE, T., BURKHARDT, F., WOLF, N., KHALIL, H. and LUEHMANN, R. (1994).

"Effects of pantoprazole on endocrine function in healthy male volunteers."

Alimentary Pharmacology & Therapeutics **8**(5): 549-554.

DAVID, D., LANG, R. M., NEUMANN, A., BOROW, K. M., AKSELROD, S. and MOR-AVI, V. (1990).

"Parasympathetically modulated antiarrhythmic action of lidocaine in atrial fibrillation."

American Heart Journal **119**(5): 1061-1068.

DE GRAUW, J. C. and VAN LOON, J. P. (2016).

"Systematic pain assessment in horses."

The Veterinary Journal **209**: 14-22.

DE LAAT, M. A., MCGOWAN, C. M., SILLENCE, M. N. and POLLITT, C. C. (2010).

"Equine laminitis: induced by 48 h hyperinsulinaemia in Standardbred horses."

Equine Veterinary Journal **42**(2): 129-135.

DEMPSHER, D. P. and GANN, D. S. (1983).

"Increased cortisol secretion after small hemorrhage is not attributable to changes in adrenocorticotropin."

Endocrinology **113**(1): 86-93.

VAN DER KOLK, J. H., KALSBECK, H. C., VANGARDEREN, E., WENSING, T. and BREUKINK, H. J. (1993).

"Equine pituitary neoplasia: a clinical report of 21 cases (1990-1992)."

Veterinary Record **133**(24): 594-597.

VAN DER KOLK, J. H., WENSING, T., KALSBECK, H. C. and BREUKINK, H. J. (1995).

"Laboratory diagnosis of equine pituitary pars intermedia adenoma."

Domestic Animal Endocrinology **12**(1): 35-39.

DICKENS, M. J. and ROMERO, L. M. (2013).

"A consensus endocrine profile for chronically stressed wild animals does not exist."

General and Comparative Endocrinology **191**: 177-189.

DIEZ DE CASTRO, E., LOPEZ, I., CORTES, B., PINEDA, C., GARFIA, B. and AGUILERA-TEJERO, E. (2014).

"Influence of feeding status, time of the day, and season on baseline adrenocorticotrophic hormone and the response to thyrotropin releasing hormone-stimulation test in healthy horses."

Domestic Animal Endocrinology **48**: 77-83.

- DONALDSON, L. L., DUNLOP, G. S., HOLLAND, M. S. and BURTON, B. A. (2000).  
"The Recovery of Horses From Inhalant Anesthesia: A Comparison of Halothane and Isoflurane."  
Veterinary Surgery **29**(1): 92-101.
- DONALDSON, M. T., JORGENSEN, A. J. R. and BEECH, J. (2004).  
"Evaluation of suspected pituitary pars intermedia dysfunction in horses with laminitis."  
Journal of the American Veterinary Medical Association **224**(7): 1123-1127.
- DONALDSON, M. T., LAMONTE, B. H., MORRESEY, P., SMITH, G. and BEECH, J. (2002).  
"Treatment with pergolide or cyproheptadine of pituitary pars intermedia dysfunction (equine Cushing's disease)."  
Journal of Veterinary Internal Medicine **16**(6): 742-746.
- DONALDSON, M. T., MCDONNELL, S. M., SCHANBACHER, B. J., LAMB, S. V., MCFARLANE, D. and BEECH, J. (2005).  
"Variation in plasma adrenocorticotrophic hormone concentration and dexamethasone suppression test results with season, age, and sex in healthy ponies and horses."  
Journal of Veterinary Internal Medicine **19**(2): 217-222.
- DOSTROVSKY, J. and CRAIG, A. (2006).  
"Ascending projection systems."  
Textbook of Pain (Wall, P. and Melzack, R.) **5th ed.**: Elsevier Churchill Livingstone: 187-203.
- DURHAM, A. E. (2016).  
"Endocrine Disease in Aged Horses."  
Veterinary Clinics of North America: Equine Practice **32**(2): 301-315.
- DURHAM, A. E., MCGOWAN, C. M., FEY, K., TAMZALI, Y. and VAN DER KOLK, J. H. (2014).  
"Pituitary pars intermedia dysfunction: Diagnosis and treatment."  
Equine Veterinary Education **26**(4): 216-223.
- DUTTON, D. W., LASHNITS, K. J. and WEGNER, K. (2009).  
"Managing severe hoof pain in a horse using multimodal analgesia and a modified composite pain score."  
Equine Veterinary Education **21**(1): 37-43.
- DYBDAL, N. O., HARGREAVES, K. M., MADIGAN, J. E., GRIBBLE, D. H., KENNEDY, P. C. and STABENFELDT, G. H. (1994).  
"Diagnostic testing for pituitary pars intermedia dysfunction in horses."  
Journal of the American Veterinary Medical Association **204**(4): 627-632.
- EAGER, R. A., NORMANN, S. E., WARAN, N. K., PRICE, J. P., WELSH, E. M. and MARLIN, D. J. (2004).  
"Repeatability, diurnal variation and temperament: factors affecting the use of heart rate variability in horses."  
Proceeding of the 38th International Congress of the ISAE(Helsinki, Finland): 235.
- EILER, H., OLIVER, J. W., ANDREWS, F. M., FECTEAU, K. A., GREEN, E. M. and MCCRACKEN, M. (1997).  
"Results of a combined dexamethasone suppression thyrotropin-releasing hormone stimulation test in healthy horses and horses suspected to have a pars intermedia pituitary adenoma."  
Journal of the American Veterinary Medical Association **211**(1): 79-81.

ENDO, Y., ISHIKAWA, Y., ARIMA, D., MAE, N., IWAMOTO, Y., KOROSUE, K., TSUZUKI, N. and HOBOS, S. (2017).

"Effects of pre-shipment enrofloxacin administration on fever and blood properties in adult Thoroughbred racehorses transported a long distance."

The Journal of Veterinary Medical Science **79**(3): 464-466.

ENGLAND, G. C. and CLARKE, K. W. (1996).

"Alpha 2 adrenoceptor agonists in the horse--a review."

The British Veterinary Journal **152**(6): 641-657.

ERBER, R., WULF, M., BECKER-BIRCK, M., KAPS, S., AURICH, J. E., MOSTL, E. and AURICH, C. (2012).

"Physiological and behavioural responses of young horses to hot iron branding and microchip implantation."

The Veterinary Journal **191**(2): 171-175.

EVANS, D. R. (1972).

"The recognition and diagnosis of a pituitary tumor in the horse."

Proceedings of the 18th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners: 417-419.

FAUST, M.-D. (2015).

"Herzfrequenzvariabilitätsmessung bei Pferden mit Kolik."

Dissertation med. vet.: Freie Universität Berlin.

FAZIO, E., MEDICA, P., ARONICA, V., GRASSO, L. and FERLAZZO, A. (2008).

"Circulating beta-endorphin, adrenocorticotrophic hormone and cortisol levels of stallions before and after short road transport: stress effect of different distances."

Acta Veterinaria Scandinavica **50**: 1-7.

FELDSEIN, J. D., WILKE, V. L., EVANS, R. B. and CONZEMIUS, M. G. (2010).

"Serum cortisol concentration and force plate analysis in the assessment of pain associated with sodium urate-induced acute synovitis in dogs."

American Journal of Veterinary Research **71**(8): 940-945.

FIGUEIREDO, J. P., MUIR, W. W. and SAMS, R. (2012).

"Cardiorespiratory, gastrointestinal, and analgesic effects of morphine sulfate in conscious healthy horses."

American Journal of Veterinary Research **73**(6): 799-808.

FOREMAN, J. H., BARANGE, A., LAWRENCE, L. M. and HUNGERFORD, L. L. (2008).

"Effects of single-dose intravenous phenylbutazone on experimentally induced, reversible lameness in the horse."

Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics **31**(1): 39-44.

FOREMAN, J. H. and RUEMLER, R. (2011).

"Phenylbutazone and flunixin meglumine used singly or in combination in experimental lameness in horses."

Equine Veterinary Journal **43**(Supplement 40): 12-17.

FRANCE, R. D., KRISHNAN, K. R., GOLI, V., MANEPALLI, A. N. and DICKSON, L. (1986).

"Preliminary study of thyrotrophin releasing hormone stimulation test in chronic low back pain patients."

Pain **27**(1): 51-55.

FRANK, N., ANDREWS, F. M., SOMMARDAHL, C. S., EILER, H., ROHRBACH, B. W. and DONNELL, R. L. (2006a).

"Evaluation of the combined dexamethasone suppression/thyrotropin-releasing hormone stimulation test for detection of pars intermedia pituitary adenomas in horses."

Journal of Veterinary Internal Medicine **20**(4): 987-993.

FRANK, N., ELLIOTT, S. B., BRANDT, L. E. and KEISLER, D. H. (2006b).

"Physical characteristics, blood hormone concentrations, and plasma lipid concentrations in obese horses with insulin resistance."

Journal of the American Veterinary Medical Association **228**(9): 1383-1390.

FUNK, R. A., STEWART, A. J., WOOLDRIDGE, A. A., KWESSI, E., KEMPPAINEN, R. J., BEHREND, E. N., ZHONG, Q. and JOHNSON, A. K. (2011).

"Seasonal changes in plasma adrenocorticotrophic hormone and alpha-melanocyte-stimulating hormone in response to thyrotropin-releasing hormone in normal, aged horses."

Journal of Veterinary Internal Medicine **25**(3): 579-585.

GEHLEN, H. and BRADARIC, Z. (2013a).

"Epidemiologische Untersuchung zur Dysfunktion der Pars Intermedia der equinen Hypophyse in Deutschland: Auswertung einer Fragebogenaktion."

Pferdeheilkunde **29**(2): 156-164.

GEHLEN, H. and BRADARIC, Z. (2013b).

"Untersuchung zur Reproduzierbarkeit von ACTH-Konzentrationen im Plasma von Pferden mit und ohne Equinem Cushing Syndrom."

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift **126**(7-8): 350-356.

GEHRKE, E. K., BALDWIN, A. and SCHILTZ, P. M. (2011).

"Heart Rate Variability in Horses Engaged in Equine-Assisted Activities."

Journal of Equine Veterinary Science **31**(2): 78-84.

GLEERUP, K. B., FORKMAN, B., LINDEGAARD, C. and ANDERSEN, P. H. (2015).

"An equine pain face."

Veterinary Anaesthesia and Analgesia **42**(1): 103-114.

GOLD, J. R., DIVERS, T. J., BARTON, M. H., LAMB, S. V., PLACE, N. J., MOHAMMED, H. O. and BAIN, F. T. (2007).

"Plasma adrenocorticotropin, cortisol, and adrenocorticotropin/cortisol ratios in septic and normal-term foals."

Journal of Veterinary Internal Medicine **21**(4): 791-796.

GOODALE, L., FRANK, N., HERMIDA, P. and D'OENCH, S. (2015).

"Evaluation of a thyrotropin-releasing hormone solution stored at room temperature for pituitary pars intermedia dysfunction testing in horses."

American Journal of Veterinary Research **76**(5): 437-444.

GOUDREAU, J. L., LINDLEY, S. E., LOOKINGLAND, K. J. and MOORE, K. E. (1992).

"Evidence that hypothalamic periventricular dopamine neurons innervate the intermediate lobe of the rat pituitary."

Neuroendocrinology **56**(1): 100-105.

GRAUBNER, C., GERBER, V., DOHERR, M. and SPADAVECCHIA, C. (2011).

"Clinical application and reliability of a post abdominal surgery pain assessment scale (PASPAS) in horses."

The Veterinary Journal **188**(2): 178-183.

- GREER, M. A., ALLEN, C. F., PANTON, P. and ALLEN, J. P. (1975).  
"Evidence that the pars intermedia and pars nervosa of the pituitary do not secrete functionally significant quantities of ACTH."  
Endocrinology **96**(3): 718-724.
- GRENAGER, N. (2010).  
"How does Cushing's disease relate to laminitis: Advances in diagnosis and treatment."  
Journal of Equine Veterinary Science **30**(9): 482-490.
- GRIMM, Y. and REICHLIN, S. (1973).  
"Thyrotropin releasing hormone (TRH): neurotransmitter regulation of secretion by mouse hypothalamic tissue in vitro."  
Endocrinology **93**(3): 626-631.
- GUNNAR, M. and QUEVEDO, K. (2007).  
"The neurobiology of stress and development."  
Annual Review of Psychology **58**: 145-173.
- HADA, T., ONAKA, T., TAKAHASHI, T., HIRAGA, A. and YAGI, K. (2003).  
"Effects of novelty stress on neuroendocrine activities and running performance in thoroughbred horses."  
Journal of Neuroendocrinology **15**(7): 638-648.
- HAGER, C., BIERNOT, S., BUETTNER, M., GLAGE, S., KEUBLER, L. M., HELD, N., BLEICH, E. M., OTTO, K., MULLER, C. W., DECKER, S., TALBOT, S. R. and BLEICH, A. (2017).  
"The Sheep Grimace Scale as an indicator of post-operative distress and pain in laboratory sheep."  
PLOS ONE **12**(4): 1-15.
- HALMER, C., FRANKEN, K. and LICKA, T. (2014).  
"Correlation of electrocardiographic parameters (heart rate variability and heart rate) with Obel grading of pain of horses with laminitis."  
Pferdeheilkunde **30**(2): 140-147.
- HARITOU, S. J. A., ZYLSTRA, R., RALLI, C., TURNER, S. and TORTONESE, D. J. (2008).  
"Seasonal changes in circadian peripheral plasma concentrations of melatonin, serotonin, dopamine and cortisol in aged horses with Cushing's disease under natural photoperiod."  
Journal of Neuroendocrinology **20**(8): 988-996.
- HART, K. A. (2012).  
"The use of cortisol for the objective assessment of stress in animals: pros and cons."  
The Veterinary Journal **192**(2): 137-139.
- HART, K. A., WOCHLE, D. M., NORTON, N. A., MCFARLANE, D., WOOLDRIDGE, A. A. and FRANK, N. (2016).  
"Effect of Age, Season, Body Condition, and Endocrine Status on Serum Free Cortisol Fraction and Insulin Concentration in Horses."  
Journal of Veterinary Internal Medicine **30**(2): 653-663.
- HEGAB, I. M. and WEI, W. (2014).  
"Neuroendocrine changes upon exposure to predator odors."  
Physiology & Behavior **131**: 149-155.

- HEINRICHS, M., BAUMGÄRTNER, W. and CAPEN, C. C. (1990).  
"Immunocytochemical demonstration of proopiomelanocortin-derived peptides in pituitary adenomas of the pars intermedia in horses."  
Veterinary Pathology **27**(6): 419-425.
- HEWETSON, M., CHRISTLEY, R. M., HUNT, I. D. and VOUTE, L. C. (2006).  
"Investigations of the reliability of observational gait analysis for the assessment of lameness in horses."  
Veterinary Record **158**(25): 852-857.
- HINCHCLIFF, K. W., RUSH, B. R. and FARRIS, J. W. (2005).  
"Evaluation of plasma catecholamine and serum cortisol concentrations in horses with colic."  
Journal of the American Veterinary Medical Association **227**(2): 276-280.
- HOLTON, L. L., SCOTT, E. M., NOLAN, A. M., REID, J. and WELSH, E. (1998).  
"Relationship between physiological factors and clinical pain in dogs scored using a numerical rating scale."  
The Journal of Small Animal Practice **39**(10): 469-474.
- HOOD, D. M. (1999).  
"Laminitis as a systemic disease."  
Veterinary Clinics of North America: Equine Practice **15**(2): 481-494.
- HOWDEN, C. W., KENYON, C. J., BEASTALL, G. H. and REID, J. L. (1986).  
"Inhibition by omeprazole of adrenocortical response to ACTH: clinical studies and experiments on bovine adrenal cortex in vitro."  
Clinical Science (London, England) **70**(1): 99-102.
- HUBER, J., ARNHOLDT, T., MOSTL, E., GELFERT, C. C. and DRILLICH, M. (2013).  
"Pain management with flunixin meglumine at dehorning of calves."  
Journal of Dairy Science **96**(1): 132-140.
- HURCOMBE, S. D. A. (2011).  
"Hypothalamic-Pituitary Gland Axis Function and Dysfunction in Horses."  
Veterinary Clinics of North America: Equine Practice **27**(1): 1-17.
- INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (1994).  
"Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage."  
Classification of Chronic Pain 2nd ed.: IASP Press, Seattle: 209-214.
- IRELAND, J. L. and MCGOWAN, C. M. (2018).  
"Epidemiology of pituitary pars intermedia dysfunction: A systematic literature review of clinical presentation, disease prevalence and risk factors."  
The Veterinary Journal **235**: 22-33.
- IRVINE, C. H. and ALEXANDER, S. L. (1994).  
"Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse."  
Domestic Animal Endocrinology **11**(2): 227-238.
- JACOB, S. I., GEOR, R. J., WEBER, P. S. D., HARRIS, P. A. and MCCUE, M. E. (2017).  
"Effect of dietary carbohydrates and time of year on ACTH and cortisol concentrations in adult and aged horses."  
Domestic Animal Endocrinology **63**: 15-22.

- JARRY, H., LEONHARDT, S., GORKOW, C. and WUTTKE, W. (1994).  
"In vitro prolactin but not LH and FSH release is inhibited by compounds in extracts of *Agnus castus*: direct evidence for a dopaminergic principle by the dopamine receptor assay."  
Experimental and Clinical Endocrinology **102**(6): 448-454.
- JOHNSON, P. J., MESSER, N. T. and GANJAM, V. K. (2004a).  
"Cushing's syndromes, insulin resistance and endocrinopathic laminitis."  
Equine Veterinary Journal **36**(3): 194-198.
- JOHNSON, P. J., MESSER, N. T., SLIGHT, S. H., WIEDMEYER, C., BUFF, P. and GANJAM, V. K. (2004b).  
"Endocrinopathic laminitis in the horse."  
Clinical Techniques in Equine Practice **3**(1): 45-56.
- JORDAN, V. J., IRELAND, J. L. and RENDLE, D. I. (2017).  
"Does oral prednisolone treatment increase the incidence of acute laminitis?"  
Equine Veterinary Journal **49**(1): 19-25.
- JULIUS, D. and MCCLESKEY, E. (2006).  
"Cellular and molecular properties of primary afferent neurons."  
Textbook of Pain (Wall, P. and Melzack, R.) **5th ed.**: Elsevier Churchill Livingstone: 35-48.
- KALPRAVIDH, M., LUMB, W. V., WRIGHT, M. and HEATH, R. B. (1984).  
"Effects of butorphanol, flunixin, levorphanol, morphine, and xylazine in ponies."  
American Journal of Veterinary Research **45**(2): 217-223.
- KATAOKA, N., HIOKI, H., KANEKO, T. and NAKAMURA, K. (2014).  
"Psychological stress activates a dorsomedial hypothalamus-medullary raphe circuit driving brown adipose tissue thermogenesis and hyperthermia."  
Cell Metabolism **20**(2): 346-358.
- KAUTZNER, J. and CAMM, A. J. (1997).  
"Clinical relevance of heart rate variability."  
Clinical Cardiology **20**(2): 162-168.
- KEEGAN, K. G., DENT, E. V., WILSON, D. A., JANICEK, J., KRAMER, J., LACARRUBBA, A., WALSH, D. M., CASSELLS, M. W., ESTHER, T. M., SCHILTZ, P., FREES, K. E., WILHITE, C. L., CLARK, J. M., POLLITT, C. C., SHAW, R. and NORRIS, T. (2010).  
"Repeatability of subjective evaluation of lameness in horses."  
Equine Veterinary Journal **42**(2): 92-97.
- KLAMMER, S. (2007).  
"Einfluss von POMC-Derivaten auf die Nebenniere."  
Dissertation med.: Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
- KOENIG, J., JARCZOK, M. N., ELLIS, R. J., HILLECKE, T. K. and THAYER, J. F. (2014).  
"Heart rate variability and experimentally induced pain in healthy adults: a systematic review."  
European Journal of Pain **18**(3): 301-314.
- KOHN, C. W. and MUIR, W. W., 3RD (1988).  
"Selected aspects of the clinical pharmacology of visceral analgesics and gut motility modifying drugs in the horse."  
Journal of Veterinary Internal Medicine **2**(2): 85-91.

KUROSAWA, M., NAGATA, S., TAKEDA, F., MIMA, K., HIRAGA, A., KAI, M. and TAYA, K. (1998).

"Plasma catecholamine, adrenocorticotropin and cortisol responses to exhaustive incremental treadmill exercise of the Thoroughbred horse."

Journal of Equine Science **9**(1): 9-18.

KUWAHARA, M., HASHIMOTO, S., ISHII, K., YAGI, Y., HADA, T., HIRAGA, A., KAI, M., KUBO, K., OKI, H., TSUBONE, H. and SUGANO, S. (1996).

"Assessment of autonomic nervous function by power spectral analysis of heart rate variability in the horse."

Journal of the autonomic nervous system **60**(1-2): 43-48.

KUWAHARA, M., HIRAGA, A., KAI, M., TSUBONE, H. and SUGANO, S. (1999).

"Influence of training on autonomic nervous function in horses: evaluation by power spectral analysis of heart rate variability."

Equine Veterinary Journal **31**(S30): 178-180.

LANGFORD, D. J., BAILEY, A. L., CHANDA, M. L., CLARKE, S. E., DRUMMOND, T. E., ECHOLS, S., GLICK, S., INGRAO, J., KLASSEN-ROSS, T., LACROIX-FRALISH, M. L., MATSUMIYA, L., SORGE, R. E., SOTOCINAL, S. G., TABAKA, J. M., WONG, D., VAN DEN MAAGDENBERG, A. M., FERRARI, M. D., CRAIG, K. D. and MOGIL, J. S. (2010).

"Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse."

Nature Methods **7**(6): 447-449.

LARSSON, M., EDQVIST, L. E., EKMAN, L. and PERSSON, S. (1979).

"Plasma cortisol in the horse, diurnal rhythm and effects of exogenous ACTH."

Acta Veterinaria Scandinavica **20**(1): 16-24.

LEE, Z. Y., ZYLSTRA, R. and HARITOU, S. J. A. (2010).

"The use of adrenocorticotrophic hormone as a potential biomarker of pituitary pars intermedia dysfunction in horses."

The Veterinary Journal **185**(1): 58-61.

LEY, S. J., LIVINGSTON, A. and WATERMAN, A. E. (1991).

"Effects of chronic lameness on the concentrations of cortisol, prolactin and vasopressin in the plasma of sheep."

Veterinary Record **129**(3): 45-47.

LEY, S. J., WATERMAN, A. E., LIVINGSTON, A. and PARKINSON, T. J. (1994).

"Effect of chronic pain associated with lameness on plasma cortisol concentrations in sheep: A field study."

Research in Veterinary Science **57**(3): 332-335.

LIEBICH, H.-G. (2004).

"Endokrines System (Systema endocrinum)."

Funktionelle Histologie der Haussäugetiere **4. Auflage**: Schattauer Verlag, Stuttgart: 384.

LIU, J. H., DACUS, A. C. and BARTELS, S. P. (1989).

"Thyrotropin releasing hormone increases intraocular pressure. Mechanism of action."

Investigative Ophthalmology & Visual Science **30**(10): 2200-2208.

LIVESEY, J. H., DONALD, R. A., IRVINE, C. H., REDEKOPP, C. and ALEXANDER, S. L. (1988).

"The effects of cortisol, vasopressin (AVP), and corticotropin-releasing factor administration on pulsatile adrenocorticotropin, alpha-melanocyte-stimulating hormone, and AVP secretion in the pituitary venous effluent of the horse."

Endocrinology **123**(2): 713-720.

LOMBARDI, F., MALLIANI, A., PAGANI, M. and CERUTTI, S. (1996).

"Heart rate variability and its sympatho-vagal modulation."

Cardiovascular Research **32**(2): 208-216.

VAN LOON, J. P. and VAN DIERENDONCK, M. C. (2015).

"Monitoring acute equine visceral pain with the Equine Utrecht University Scale for Composite Pain Assessment (EQUUS-COMPASS) and the Equine Utrecht University Scale for Facial Assessment of Pain (EQUUS-FAP): A scale-construction study."

The Veterinary Journal **206**(3): 356-364.

VAN LOON, J. P. and VAN DIERENDONCK, M. C. (2017).

"Monitoring equine head-related pain with the Equine Utrecht University scale for facial assessment of pain (EQUUS-FAP)."

The Veterinary Journal **220**: 88-90.

VAN LOON, J. P. A. M., BACK, W., HELLEBREKERS, L. J. and VAN WEEREN, P. R. (2010).

"Application of a Composite Pain Scale to objectively monitor horses with somatic and visceral pain under hospital conditions."

Journal of Equine Veterinary Science **30**(11): 641-649.

VAN LOON, J. P. A. M., JONCKHEER-SHEEHY, V. S. M., BACK, W., RENE VAN WEEREN, P. and HELLEBREKERS, L. J. (2014).

"Monitoring equine visceral pain with a composite pain scale score and correlation with survival after emergency gastrointestinal surgery."

The Veterinary Journal **200**(1): 109-115.

MAIANTE, A. A., TEIXEIRA NETO, F. J., BEIER, S. L., CORRENTE, J. E. and PEDROSO, C. E. (2009).

"Comparison of the cardio-respiratory effects of methadone and morphine in conscious dogs."

Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics **32**(4): 317-328.

MAIR, T. S., SHERLOCK, C. E. and BODEN, L. A. (2014).

"Serum cortisol concentrations in horses with colic."

The Veterinary Journal **201**(3): 370-377.

MALIK, M. and CAMM, A. J. (1990).

"Heart rate variability."

Clinical Cardiology **13**(8): 570-576.

MARTIN, L. G., GROMAN, R. P., FLETCHER, D. J., BEHREND, E. N., KEMPPAINEN, R. J., MOSER, V. R. and HICKEY, K. C. (2008).

"Pituitary-adrenal function in dogs with acute critical illness."

Journal of the American Veterinary Medical Association **233**(1): 87-95.

MASTRO, L. M., ADAMS, A. A. and URSCHER, K. L. (2015).

"Pituitary pars intermedia dysfunction does not necessarily impair insulin sensitivity in old horses."

Domestic Animal Endocrinology **50**: 14-25.

MATHEWS, K., KRONEN, P. W., LASCELLES, D., NOLAN, A., ROBERTSON, S., STEAGALL, P. V., WRIGHT, B. and YAMASHITA, K. (2014).

"Guidelines for recognition, assessment and treatment of pain: WSAVA Global Pain Council members and co-authors of this document."

The Journal of Small Animal Practice **55**(6): E10-68.

MAY, A. (2007).

"Evaluierung von Stressparametern beim Pferd im Zusammenhang mit dem Klinikaufenthalt."

Dissertation med. vet.: Ludwig-Maximilians-Universität München.

MCFARLANE, D. (2006).

"Role of the equine hypothalamic pituitary pars intermedia axis in health and disease."

Proceedings of the 52nd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners(San Antonio, Texas): 55-59.

MCFARLANE, D. (2011).

"Equine pituitary pars intermedia dysfunction."

Veterinary Clinics of North America: Equine Practice **27**(1): 93-113.

MCFARLANE, D., BANSE, H., KNYCH, H. K. and MAXWELL, L. K. (2017).

"Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of pergolide mesylate following long-term administration to horses with pituitary pars intermedia dysfunction."

Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics **40**(2): 158-164.

MCFARLANE, D., BEECH, J. and CRIBB, A. (2006).

"Alpha-melanocyte stimulating hormone release in response to thyrotropin releasing hormone in healthy horses, horses with pituitary pars intermedia dysfunction and equine pars intermedia explants."

Domestic Animal Endocrinology **30**(4): 276-288.

MCFARLANE, D. and CRIBB, A. E. (2005a).

"Systemic and pituitary pars intermedia antioxidant capacity associated with pars intermedia oxidative stress and dysfunction in horses."

American Journal of Veterinary Research **66**(12): 2065-2072.

MCFARLANE, D., DONALDSON, M. T., SALEH, T. M. and CRIBB, A. (2003).

"The role of dopaminergic neurodegeneration in equine pituitary pars intermedia dysfunction (equine cushing's disease)."

Proceedings of the 49th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners(New Orleans, Louisiana): 233-237.

MCFARLANE, D., DYBDAL, N., DONALDSON, M. T., MILLER, L. and CRIBB, A. E. (2005b).

"Nitration and increased alpha-synuclein expression associated with dopaminergic neurodegeneration in equine pituitary pars intermedia dysfunction."

Journal of Neuroendocrinology **17**(2): 73-80.

MCFARLANE, D., HILL, K. and ANTON, J. (2015).

"Neutrophil function in healthy aged horses and horses with pituitary dysfunction."

Veterinary Immunology and Immunopathology **165**(3-4): 99-106.

MCGOWAN, C. M., FROST, R., PFEIFFER, D. U. and NEIGER, R. (2004).

"Serum insulin concentrations in horses with equine Cushing's syndrome: response to a cortisol inhibitor and prognostic value."

Equine Veterinary Journal **36**(3): 295-298.

- MCGOWAN, T. W., PINCHBECK, G. P. and MCGOWAN, C. M. (2013a).  
"Evaluation of basal plasma alpha-melanocyte-stimulating hormone and adrenocorticotrophic hormone concentrations for the diagnosis of pituitary pars intermedia dysfunction from a population of aged horses."  
Equine Veterinary Journal **45**(1): 66-73.
- MCGOWAN, T. W., PINCHBECK, G. P. and MCGOWAN, C. M. (2013b).  
"Prevalence, risk factors and clinical signs predictive for equine pituitary pars intermedia dysfunction in aged horses."  
Equine Veterinary Journal **45**(1): 74-79.
- MEEUSE, J. J., LOWIK, M. S. P., LOWIK, S. A. M., AARDEN, E., VAN ROON, A. M., GANS, R. O. B., VAN WIJHE, M., LEFRANDT, J. D. and REYNERS, A. K. L. (2013).  
"Heart rate variability parameters do not correlate with pain intensity in healthy volunteers."  
Pain Medicine **14**(8): 1192-1201.
- MELLOR, D., STAFFORD, K., TODD, S., LOWE, T., GREGORY, N., BRUCE, R. and WARD, R. (2002).  
"A comparison of catecholamine and cortisol responses of young lambs and calves to painful husbandry procedures."  
Australian Veterinary Journal **80**(4): 228-233.
- MELLOR, D. J., MOLONY, V. and ROBERTSON, I. S. (1991).  
"Effects of castration on behaviour and plasma cortisol concentrations in young lambs, kids and calves."  
Research in Veterinary Science **51**(2): 149-154.
- MENZIES-GOW, N. J., STEVENS, K. B., SEPULVEDA, M. F., JARVIS, N. and MARR, C. M. (2010).  
"Repeatability and reproducibility of the Obel grading system for equine laminitis."  
Veterinary Record **167**(2): 52-55.
- MEYER, R., RINGKAMP, M., CAMPBELL, J. and RAJA, S. (2006).  
"Peripheral mechanisms of cutaneous nociception."  
Textbook of Pain (Wall, P. and Melzack, R.) 5th ed.: Elsevier Churchill Livingstone: 3-34.
- MICHALOUDIS, D., KOCHIADAKIS, G., GEORGOPOULOU, G., FRAIDAKIS, O., CHLOUVERAKIS, G., PETROU, A. and POLLARD, B. J. (1998).  
"The influence of premedication on heart rate variability."  
Anaesthesia **53**(5): 446-453.
- MILLER, M. A., PARDO, I. D., JACKSON, L. P., MOORE, G. E. and SOJKA, J. E. (2008).  
"Correlation of pituitary histomorphometry with adrenocorticotrophic hormone response to domperidone administration in the diagnosis of equine pituitary pars intermedia dysfunction."  
Veterinary Pathology **45**(1): 26-38.
- MILLINGTON, W. R., DYBDAL, N. O., DAWSON, R., JR., MANZINI, C. and MUELLER, G. P. (1988).  
"Equine Cushing's disease: Differential regulation of beta-endorphin processing in tumors of the intermediate pituitary."  
Endocrinology **123**(3): 1598-1604.
- MILLS, P. C., NG, J. C., KRAMER, H. and AUER, D. E. (1997).  
"Stress response to chronic inflammation in the horse."  
Equine Veterinary Journal **29**(6): 483-486.

MOLONY, V. and KENT, J. E. (1997).

"Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements."  
Journal of Animal Science **75**(1): 266-272.

MOORE, J. N., STEISS, J., NICHOLSON, W. E. and ORTH, D. N. (1979).

"A case of pituitary adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome in the horse."  
Endocrinology **104**(3): 576-582.

MORRIS, D. D. and GARCIA, M. C. (1985).

"Effects of phenylbutazone and anabolic steroids on adrenal and thyroid gland function tests in healthy horses."

American Journal of Veterinary Research **46**(2): 359-364.

MORTON, A. J., VARNEY, C. R., EKIRI, A. B. and GROSCHE, A. (2011).

"Cardiovascular effects of N-butylscopolammonium bromide and xylazine in horses."  
Equine Veterinary Journal **43**(Supplement 39): 117-122.

MUHTZ, C., RODRIGUEZ-RAECKE, R., HINKELMANN, K., MOELLER-BERTRAM, T., KIEFER, F., WIEDEMANN, K., MAY, A. and OTTE, C. (2013).

"Cortisol response to experimental pain in patients with chronic low back pain and patients with major depression."

Pain Medicine **14**(4): 498-503.

MUIR, W. W. (2010a).

"Pain: Mechanisms and management in horses."

Veterinary Clinics of North America: Equine Practice **26**(3): 467-480.

MUIR, W. W. (2010b).

"Recognizing and treating pain in horses."

Equine Internal Medicine (Reed, S., Bayly, W. and Sellon, D.) 3rd ed.: Saunders Elsevier: 233-245.

MUIR, W. W. (2013).

"Stress and pain: Their relationship to health related quality of life (HRQL) for horses."

Equine Veterinary Journal **45**(6): 653-655.

MUIR, W. W., SKARDA, R. T. and SHEEHAN, W. C. (1978).

"Cardiopulmonary effects of narcotic agonists and a partial agonist in horses."

American Journal of Veterinary Research **39**(10): 1632-1635.

MUIR, W. W. and WOOLF, C. J. (2001).

"Mechanisms of pain and their therapeutic implications."

Journal of the American Veterinary Medical Association **219**(10): 1346-1356.

MUNSTERS, C. C., DE GOOIJER, J. W., VAN DEN BROEK, J. and VAN OLDRIJTBORGH-OOSTERBAAN, M. M. (2013).

"Heart rate, heart rate variability and behaviour of horses during air transport."

Veterinary Record **172**(1): 15.

NAPIER, L. D., STANFILL, A., YOSHISHIGE, D. A., JACKSON, K. E., BARRON, B. A. and CAFFREY, J. L. (1998).

"Autonomic control of heart rate in dogs treated chronically with morphine."

The American Journal of Physiology **275**(6 Pt 2): H2199-2210.

NICKEL, R., SCHUMMER, A. and SEIFERLE, E. (2004).

"Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen."

Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band IV: Parey Verlag, Stuttgart: 473-482.

NIINISTÖ, K. E., KOROLAINEN, R. V., RAEKALLIO, M. R., MYKKANEN, A. K., KOHO, N. M., RUOHONIEMI, M. O., LEPPALUOTO, J. and POSO, A. R. (2010).

"Plasma levels of heat shock protein 72 (HSP72) and beta-endorphin as indicators of stress, pain and prognosis in horses with colic."

The Veterinary Journal **184**(1): 100-104.

OBEL, N. (1948).

"Studies on the Histopathology of Acute Laminitis."

Almqvist an Wisells Boktryckeri

OEL, C., GERHARDS, H. and GEHLEN, H. (2006).

"Einfluss von Schmerzstimuli auf die Herzfrequenzvariabilität bei Pferden in Allgemeinanästhesie."

Pferdeheilkunde **2**(26): 232-238.

OHMURA, H., HIRAGA, A., AIDA, H., KUWAHARA, M. and TSUBONE, H. (2001).

"Effects of repeated atropine injection on heart rate variability in Thoroughbred horses."

Journal of Veterinary Medical Science **63**(12): 1359-1360.

OKADA, T., SHIMOMURO, T., OIKAWA, M., NAMBO, Y., KISO, Y., MORIKAWA, Y., LIPTRAP, R. M., YAMASHIRO, S., LITTLE, P. B. and SASAKI, F. (1997).

"Immunocytochemical localization of adrenocorticotrophic hormone-immunoreactive cells of the pars intermedia in thoroughbreds."

American Journal of Veterinary Research **58**(8): 920-924.

ORTH, D. N., HOLSCHER, M. A., WILSON, M. G., NICHOLSON, W. E., PLUE, R. E. and MOUNT, C. D. (1982a).

"Equine Cushing's disease: plasma immunoreactive proopiomelanocortin peptide and cortisol levels basally and in response to diagnostic tests."

Endocrinology **110**(4): 1430-1441.

ORTH, D. N. and NICHOLSON, W. E. (1982b).

"Bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin in normal equine pituitary and in pituitary tumors of horses with Cushing's disease."

Endocrinology **111**(2): 559-563.

PADALINO, B., RAIDAL, S. L., CARTER, N., CELI, P., MUSCATELLO, G., JEFFCOTT, L. and DE SILVA, K. (2017).

"Immunological, clinical, haematological and oxidative responses to long distance transportation in horses."

Research in Veterinary Science **115**: 78-87.

PAKKANEN, S. A. E., DE VRIES, A., RAEKALLIO, M. R., MYKKANEN, A. K., PALVIAINEN, M. J., SANKARI, S. M. and VAINIO, O. M. (2018).

"Changes in energy metabolism, and levels of stress-related hormones and electrolytes in horses after intravenous administration of romifidine and the peripheral alpha-2 adrenoceptor antagonist vatinoxan."

Acta Veterinaria Scandinavica **60**(1): 27.

PAWLUSKI, J., JEGO, P., HENRY, S., BRUCHET, A., PALME, R., COSTE, C. and HAUSBERGER, M. (2017).

"Low plasma cortisol and fecal cortisol metabolite measures as indicators of compromised welfare in domestic horses (*Equus caballus*)."

PLOS ONE **12**(9): 1-18.

PEETERS, B., LANGOUCHE, L. and VAN DEN BERGHE, G. (2017).

"Adrenocortical Stress Response during the Course of Critical Illness."

Comprehensive Physiology **8**(1): 283-298.

PERKINS, G. A., LAMB, S., ERB, H. N., SCHANBACHER, B., NYDAM, D. V. and DIVERS, T. J. (2002).

"Plasma adrenocorticotropin (ACTH) concentrations and clinical response in horses treated for equine Cushing's disease with cyproheptadine or pergolide."

Equine Veterinary Journal **34**(7): 679-685.

PICKER, O., SCHEEREN, T. W. and ARNDT, J. O. (2001).

"Inhalation anaesthetics increase heart rate by decreasing cardiac vagal activity in dogs."

British Journal of Anaesthesia **87**(5): 748-754.

PLACE, N. J., MCGOWAN, C. M., LAMB, S. V., SCHANBACHER, B. J., MCGOWAN, T. and WALSH, D. M. (2010).

"Seasonal variation in serum concentrations of selected metabolic hormones in horses."

Journal of Veterinary Internal Medicine **24**(3): 650-654.

POLAND, R. E., HANADA, K. and RUBIN, R. T. (1989).

"Relationship of nocturnal plasma bioactive and immunoactive ACTH concentrations to cortisol secretion in normal men."

Acta Endocrinologica **121**(6): 857-865.

PONGRATZ, M. C., GRAUBNER, C. and ESER, M. W. (2010).

"Equines Cushing Syndrom: Wirkung einer Langzeittherapie mit Pergolid "

Pferdeheilkunde **26**(4): 598-603.

PRICE, J., CATRIONA, S., WELSH, E. M. and WARAN, N. K. (2003).

"Preliminary evaluation of a behaviour-based system for assessment of post-operative pain in horses following arthroscopic surgery."

Veterinary Anaesthesia and Analgesia **30**(3): 124-137.

PRITCHETT, L. C., ULIBARRI, C., ROBERTS, M. C., SCHNEIDER, R. K. and SELLON, D. C. (2003).

"Identification of potential physiological and behavioral indicators of postoperative pain in horses after exploratory celiotomy for colic."

Applied Animal Behaviour Science **80**(1): 31-43.

PRITTIE, J. E., BARTON, L. J., PETERSON, M. E., KEMPPAINEN, R. J., HERR, L. G. and FOX, P. R. (2002).

"Pituitary ACTH and adrenocortical secretion in critically ill dogs."

Journal of the American Veterinary Medical Association **220**(5): 615-619.

PRUTTON, J. S., KASS, P. H., WATSON, J. L. and PUSTERLA, N. (2015).

"Pre-analytical stability of adrenocorticotrophic hormone from healthy horses in whole blood, plasma and frozen plasma samples."

The Veterinary Journal **204**(1): 123-124.

- RAEKALLIO, M., LEINO, A., VAINIO, O. and SCHEININ, M. (1992).  
"Sympatho-adrenal activity and the clinical sedative effect of detomidine in horses."  
Equine Veterinary Journal **24**(S11): 66-68.
- RAEKALLIO, M., TAYLOR, P. M. and BENNETT, R. C. (1997a).  
"Preliminary investigations of pain and analgesia assessment in horses administered phenylbutazone or placebo after arthroscopic surgery."  
Veterinary Surgery **26**(2): 150-155.
- RAEKALLIO, M., TAYLOR, P. M. and BLOOMFIELD, M. (1997b).  
"A comparison of methods for evaluation of pain and distress after orthopaedic surgery in horses."  
Journal of Veterinary Anesthesiology **24**(2): 17-20.
- RASSOW, J., HAUSER, K., NETZKER, R. and DUEUTZMANN, R. (2008).  
"Hormone des hypothalamisch-hypophysären Systems."  
Duale Reihe Biochemie 2. Auflage: Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 582-583.
- REDEKOPP, C., IRVINE, C. H. G., DONALD, R. A., LIVESEY, J. H., SADLER, W., NICHOLLS, M. G., ALEXANDER, S. L. and EVANS, M. J. (1986).  
"Spontaneous and stimulated adrenocorticotropin and vasopressin pulsatile secretion in the pituitary venous effluent of the horse."  
Endocrinology **118**(4): 1410-1416.
- RENDLE, D. I., LITCHFIELD, E., GOUGH, S., COWLING, A. and HUGHES, K. J. (2015).  
"The effects of sample handling and N-phenylmaleimide on concentration of adrenocorticotrophic hormone in equine plasma."  
Equine Veterinary Journal **47**(5): 587-591.
- RIETMANN, T. R., STAUFFACHER, M., BERNASCONI, P., AUER, J. A. and WEISHAUP, M. A. (2004a).  
"The association between heart rate, heart rate variability, endocrine and behavioural pain measures in horses suffering from laminitis."  
Journal of Veterinary Medicine, Series A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine **51**(5): 218-225.
- RIETMANN, T. R., STUART, A. E. A., BERNASCONI, P., STAUFFACHER, M., AUER, J. A. and WEISHAUP, M. A. (2004b).  
"Assessment of mental stress in warmblood horses: heart rate variability in comparison to heart rate and selected behavioural parameters."  
Applied Animal Behaviour Science **88**(1-2): 121-136.
- ROBERTSON, S. A., SANCHEZ, L. C., MERRITT, A. M. and DOHERTY, T. J. (2005).  
"Effect of systemic lidocaine on visceral and somatic nociception in conscious horses."  
Equine Veterinary Journal **37**(2): 122-127.
- ROELVINK, M. E., GOOSSENS, L., KALSBECK, H. C. and WENSING, T. (1991).  
"Analgesic and spasmolytic effects of dipyron, hyoscine-N-butylbromide and a combination of the two in ponies."  
Veterinary Record **129**(17): 378-380.
- SAIARDI, A. and BORRELLI, E. (1998).  
"Absence of dopaminergic control on melanotrophs leads to Cushing's-like syndrome in mice."  
Molecular Endocrinology **12**(8): 1133-1139.

SALAND, L. C. (2001).

"The mammalian pituitary intermediate lobe: an update on innervation and regulation."  
Brain Research Bulletin **54**(6): 587-593.

SANCHEZ, L. C. and ROBERTSON, S. A. (2014).

"Pain control in horses: What do we really know?"  
Equine Veterinary Journal **46**(4): 1-7.

SCHMIDT, A., MOSTL, E., WEHNERT, C., AURICH, J., MULLER, J. and AURICH, C. (2010).

"Cortisol release and heart rate variability in horses during road transport."  
Hormones and Behavior **57**(2): 209-215.

SCHONBOM, H., KASSENS, A., HOPSTER-IVERSEN, C., KLEWITZ, J., PIECHOTTA, M., MARTINSSON, G., KISSLER, A., BURGER, D. and SIEME, H. (2015).

"Influence of transrectal and transabdominal ultrasound examination on salivary cortisol, heart rate, and heart rate variability in mares."

Theriogenology **83**(4): 749-756.

SCHOTT, H., ANDREWS, F., DURHAM, A., FRANK, N., HART, K., KRITCHEVSKY, J., MCFARLANE, D. and TADROS, L. (2017).

"Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Pituitary Pars Intermedia Dysfunction (PPID)."

Available at: <http://sites.tufts.edu/equineendogroup/>.

SCHOTT, H. C. (2002).

"Pituitary pars intermedia dysfunction: Equine Cushing's disease."  
Veterinary Clinics of North America: Equine Practice **18**(2): 237-270.

SCHOTT, H. C. (2006).

"Pituitary pars intermedia dysfunction: Challenges of diagnosis and treatment."

Proceedings of the 52nd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners(Texas): 60-73.

SCHOTT, H. C., COURSEN, C. L., EBERHART, S. W., NACHREINER, R. J., REFSAL, K. R., EWART, S. L. and MARTENIUK, J. V. (2001).

"The Michigan Cushing's Project."

Proceedings of the 47th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners(San Diego, California): 22-24.

SECOMBE, C. J., BAILEY, S. R., DE LAAT, M. A., HUGHES, K. J., STEWART, A. J., SONIS, J. M. and TAN, R. (2018).

"Equine pituitary pars intermedia dysfunction: current understanding and recommendations from the Australian and New Zealand Equine Endocrine Group."

Australian Veterinary Journal: <https://doi.org/10.1111/avj.12716>.

SELLON, D. C., ROBERTS, M. C., BLIKSLAGER, A. T., ULIBARRI, C. and PAPICH, M. G. (2004).

"Effects of continuous rate intravenous infusion of butorphanol on physiologic and outcome variables in horses after celiotomy."

Journal of Veterinary Internal Medicine **18**(4): 555-563.

SMIET, E., VAN DIERENDONCK, M. C., SLEUTJENS, J., MENHEERE, P. P., VAN BRED, E., DE BOER, D., BACK, W., WIJNBERG, I. D. and VAN DER KOLK, J. H. (2014).

"Effect of different head and neck positions on behaviour, heart rate variability and cortisol levels in lunged Royal Dutch Sport horses."

The Veterinary Journal **202**(1): 26-32.

SOMMER, K. (2003).

"Das Equine Cushing-Syndrom: Entwicklung eines ACTH-Bioassays für die Ermittlung des biologisch-immunreaktiven Verhältnisses von endogenem ACTH in equinen Blutproben."

Dissertation med. vet.: Tierärztliche Hochschule Hannover.

SRITHUNYARAT, T., HAGMAN, R., HOGLUND, O. V., STRIDSBERG, M., OLSSON, U., HANSON, J., NONTHAKOTR, C., LAGERSTEDT, A. S. and PETTERSSON, A. (2017).

"Catestatin, vasostatin, cortisol, and pain assessments in dogs suffering from traumatic bone fractures."

BMC Research Notes **10**(1): 1-10.

STASHAK, T. S. (1989).

"Lahmheit "

Adams' Lahmheit bei Pferden 4th ed.: Lea & Febiger, Philadelphia, USA: 486-785.

STEWART, M., STAFFORD, K. J., DOWLING, S. K., SCHAEFER, A. L. and WEBSTER, J. R. (2008).

"Eye temperature and heart rate variability of calves disbudded with or without local anaesthetic."

Physiology & Behavior **93**(4-5): 789-797.

STRITTMATTER, M., BIANCHI, O., OSTERTAG, D., GRAUER, M., PAULUS, C., FISCHER, C. and MEYER, S. (2005).

"Funktionsstörung der hypothalamisch-hypophysär-adrenalen Achse bei Patienten mit akuten, chronischen und intervallartigen Schmerzsyndromen."

Schmerz **19**(2): 109-116.

SUTTON, G. A., PALTIEL, O., SOFFER, M. and TURNER, D. (2013).

"Validation of two behaviour-based pain scales for horses with acute colic."

The Veterinary Journal **197**(3): 646-650.

TADROS, E. M., FOWLIE, J. G., REFSAL, K. R., MARTENIUK, J. and SCHOTT, H. C., 2ND (2018).

"Association between hyperinsulinaemia and laminitis severity at the time of pituitary pars intermedia dysfunction diagnosis."

Equine Veterinary Journal **51**(1): 1-5.

TARVAINEN, M. P., NISKANEN, J. P., LIPPONEN, J. A., RANTA-AHO, P. O. and KARJALAINEN, P. A. (2014).

"Kubios HRV--heart rate variability analysis software."

Computer Methods and Programs in Biomedicine **113**(1): 210-220.

TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY (1996).

"Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation and clinical use."

European Heart Journal **17**(3): 354-381.

- TAYLOR, P. M. (1989).  
"Equine stress responses to anaesthesia."  
British Journal of Anaesthesia **63**(6): 702-709.
- TAYLOR, P. M., PASCOE, P. J. and MAMA, K. R. (2002).  
"Diagnosing and treating pain in the horse: Where are we today."  
Veterinary Clinics of North America: Equine Practice **18**(1): 1-19.
- TENNANT, F. (2012).  
"How to use adrenocorticotropin as a biomarker in pain management."  
Practical Pain Management **12**(10): 62-66.
- TENNANT, F. (2013b).  
"The physiologic effects of pain on the endocrine system."  
Pain and Therapy **2**(2): 75-86.
- TENNANT, F. (2017).  
"Adrenocorticotropin (ACTH) in Chronic Pain."  
Journal of Applied Biobehavioral Research **22**(3): 1-7.
- TENNANT, F. and HERMANN, L. (2002).  
"Normalization of serum cortisol concentration with opioid treatment of severe chronic pain."  
Pain Medicine **3**(2): 132-134.
- TICE, L. W. and ENGEL, A. G. (1967).  
"The effects of glucocorticoids on red and white muscles in the rat."  
The American Journal of Pathology **50**(2): 311-333.
- TOBIN, T., CHAY, S., KAMERLING, S., WOODS, W. E., WECKMAN, T. J., BLAKE, J. W. and LEES, P. (1986).  
"Phenylbutazone in the horse: a review."  
Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics **9**(1): 1-25.
- TODD, A. and KOERBER, R. (2006).  
"Neuroanatomical substrates of spinal nociception."  
Textbok of pain (Wall, P. and Melzack, R.) **5th ed.**: Elsevier Churchill Livingstone: 73-90.
- TOWNS, T. J., STEWART, A. J., HACKETT, E., ZHONG, Q., MUNSTERMANN, A., WOOLDRIDGE, A. A., FUNK, R. A. and HEWES, C. A. (2010).  
"Cortisol and ACTH concentrations in ill horses throughout 6 days of hospitalisation."  
Journal of Veterinary Emergency and Critical Care **20** (S1): A16-17.
- VAN DIERENDONCK, M. C. and VAN LOON, J. P. (2016).  
"Monitoring acute equine visceral pain with the Equine Utrecht University Scale for Composite Pain Assessment (EQUUS-COMPASS) and the Equine Utrecht University Scale for Facial Assessment of Pain (EQUUS-FAP): A validation study."  
The Veterinary Journal **216**: 175-177.
- VINUELA-FERNANDEZ, I., JONES, E., CHASE-TOPPING, M. E. and PRICE, J. (2011).  
"Comparison of subjective scoring systems used to evaluate equine laminitis."  
The Veterinary Journal **188**(2): 171-177.

VOSS, B., MOHR, E. and KRZYWANEK, H. (2002).

"Effects of aqua-treadmill exercise on selected blood parameters and on heart-rate variability of horses."

Journal of Veterinary Medicine, Series A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine **49**(3): 137-143.

WAGNER, A. E. (2010).

"Effects of stress on pain in horses and incorporating pain scales for equine practice."

Veterinary Clinics of North America: Equine Practice **26**(3): 481-492.

WARDLAW, S. L. (2011).

"Hypothalamic proopiomelanocortin processing and the regulation of energy balance."

European Journal of Pharmacology **660**(1): 213-219.

WEISSMAN, C. (1990).

"The metabolic response to stress: an overview and update."

Anesthesiology **73**(2): 308-327.

WILSON, M. G., NICHOLSON, W. E., HOLSCHER, M. A., SHERRELL, B. J., MOUNT, C. D. and ORTH, D. N. (1982).

"Proopiolipomelanocortin peptides in normal pituitary, pituitary tumor, and plasma of normal and Cushing's horses."

Endocrinology **110**(3): 941-954.

YASUMA, F. and HAYANO, J. (2004).

"Respiratory sinus arrhythmia: why does the heartbeat synchronize with respiratory rhythm?"

Chest **125**(2): 683-690.

ZEBISCH, A., MAY, A., REESE, S. and GEHLEN, H. (2014).

"Effect of different head-neck positions on physical and psychological stress parameters in the ridden horse."

Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition **98**(5): 901-907.

## 9. Anhang

### 9.1. Untersuchungsbogen

**Ankunft Pferdeklunik:**

Datum:

**Eigene Untersuchung:**

Datum:

Uhrzeit:

**Besitzer:**

Name:

**Vetera Nummer:**

Anschrift:

**Patient:**

Name	
Rasse	
Alter	
Geschlecht	
Gewicht	
Größe	

**Krankheitsgruppe:**

Kontrolle	
Koliker	
Hufrehe	
Andere orthopädische Erkrankung	

**Anamnese/Vorbehandlungen:****Diagnose:****Klinische Anzeichen auf PPID:**

	Ja	Nein
Hypertrichose		
Hyperhidrosis		
Abnormale Fettumverteilung		
Senkrücken/Pendelabdomen		

**Allgemeinuntersuchung:**

	o.b.B bzw. Angabe	Abweichungen
Haltung		
Verhalten		
Herzfrequenz (Schläge/Min)		
Atemfrequenz (Züge/Min)		
Innere Körpertemperatur		
Schleimhäute		
KFZ		
Mandibularlymphknoten		
Darmpéristaltik		

**Blutbild:**

	gemessen	Referenzbereich
WBC ( $10^3/\mu\text{L}$ )		5 - 10
Hkt manuell (%)		30 - 45
TP manuell (g/dL)		5,5 - 7,5

**Blutgasanalyse:**

	gemessen	Referenzbereich
Laktat (mmol/l)		0,03 - 1,0
pH		7,35 - 7,45

**Medikamente:**

Medikament	Dosierung	Beginn der Medikation (Datum) und Anzahl der Tage	Häufigkeit und Zeitpunkt der Gabe (x mal täglich, morgens/mittags/abends)

**Medikamente am Tag der Messung:**

Medikament	Dosierung	Uhrzeit

Beurteilung des Pferdes nach der Schmerzskala

EKG zur Bestimmung der HFV

Uhrzeit:

Blutentnahme zur Messung von ACTH und Kortisol

Blumentnahme per:

Spritze

Katheter

Uhrzeit:

Zentrifugiert um:

TRH-Injektion für den TRH-Stimulationstest

Uhrzeit:

Blutentnahme (für ACTH und Kortisol) 30 Minuten nach TRH-Injektion

Uhrzeit:

Zentrifugiert um:

Plasma/Serum eingefroren am: \_\_\_\_\_

Plasma/Serum ans Labor geschickt am: \_\_\_\_\_

Tage zwischen Einfrieren und Abschicken ans Labor: \_\_\_\_\_ Tag(e)

## 9.2. Schmerzskala

Modifiziert nach BUSSIÈRES et al. (2008), GRAUBNER et al. (2011), RIETMANN et al. (2004), DALLA COSTA et al. (2014).

Obel Skala übersetzt und modifiziert nach OBEL (1948).

Einteilung der Lahmheitsgrade adaptiert von der American Association of Equine Practitioners (AAEP).

### Allgemeiner Teil

Parameter	Wert/Anzeichen	Score
Verhalten/ Bewegungen	Pferd steht entspannt oder zeigt ruhige Bewegungen.	0
	Reduzierte Bewegung oder milde Unruhe.	1
	Widerwille sich zu bewegen oder mittelgradige Unruhe.	2
	Bewegt sich nicht, erscheint introvertiert oder unkontrollierbare Vorwärtsbewegungen.	3
Appetit/ Futteraufnahme	Frisst bereitwillig Heu (trägt evtl. einen Maulkorb).	0
	Frisst nur zögernd Heu.	1
	Zeigt nur geringes Interesse am Heu, frisst nur einige Halme oder nimmt Heu ins Maul aber kaut und schluckt nicht.	2
	Zeigt kein Interesse am Heu und frisst auch keines.	3
Schwitzen	Kein Schwitzen, trockenes Fell.	0
	Fell fühlt sich klamm an.	1
	Fell fühlt sich feucht an, Schweißperlen sichtbar.	2
	Starkes Schwitzen, Schweiß läuft vom Körper.	3
Herzfrequenz	22 - 44	0
	45 - 52	1
	53 - 60	2
	> 60	3

Atemfrequenz	< 20	0
	20 - 24	1
	25 - 30	2
	> 30	3
Innere Körpertemperatur	36,9°C - 38,5°C	0
	36,4°C - 36,9°C oder 38,5°C - 39,0°C	1
	35,9°C - 36,4°C oder 39,0°C - 39,5°C	2
	35,4°C - 35,9°C oder 39,5°C - 40,0°C	3

Maximaler Score (Allgemein): **18**

Ermittelter Score (Allgemein): \_\_\_\_\_

Prozent (Allgemein): \_\_\_\_\_

### **Zusätzliche Parameter bei Pferden mit Kolik**

<b>Parameter</b>	<b>Wert/Anzeichen</b>	<b>Score</b>
Darmmotilität	Normale Motilität (++)	0
	Verminderte Motilität (+)	1
	Keine Motilität (-)	2
	Hypermotilität (+++)	3
Gegen den Bauch treten	Pferd steht ruhig, kein gegen den Bauch treten.	0
	Gelegentliches gegen den Bauch treten. (1 - 2 Mal in 5 Minuten)	1
	Regelmäßiges gegen den Bauch treten. (3 - 4 Mal in 5 Minuten)	2
	Exzessives gegen den Bauch treten. (> 5 Mal in 5 Minuten)	3
Scharren	Pferd steht ruhig, kein Scharren.	0
	Gelegentliches Scharren. (1 - 2 Mal in 5 Minuten)	1
	Regelmäßiges Scharren. (3 - 4 Mal in 5 Minuten)	2
	Exzessives Scharren. (> 5 Mal in 5 Minuten)	3
Kopfbewegungen	Kein Anzeichen auf Unwohlsein, Kopf wird überwiegend gerade vor dem Körper gehalten.	0

	Intermittierende, seitliche oder vertikale Kopfbewegungen, gelegentliches auf die Flanke schauen (1 - 2 Mal in 5 Minuten) und/oder Hochziehen der Lippen (1 - 2 Mal in 5 Minuten).	1
	Intermittierende, heftige, seitliche oder vertikale Kopfbewegungen, regelmäßiges auf die Flanke schauen (3 - 4 Mal in 5 Minuten) und/oder Hochziehen der Lippen (3 - 4 Mal in 5 Minuten).	2
	Kontinuierliche Kopfbewegungen, exzessives auf die Flanke schauen (> 5 Mal in 5 Minuten) und/oder Hochziehen der Lippen (> 5 Mal in 5 Minuten).	3
Hinlegen, Wälzen	Pferd steht ruhig in der Box.	0
	Gelegentliches Hinlegen.	1
	Regelmäßiges Hinlegen und wieder Aufstehen, Wälzen.	2
	Pferd wirft sich wiederholt unkontrolliert hin und wälzt sich auf dem Boden.	3
Palpation der Operationswunde	Keine Reaktion auf die Palpation.	0
	Ggr. Schmerzreaktion bei Palpation.	1
	Pferd widersetzt sich beim Versuch die Wunde zu palpieren, mgr. Schmerzreaktion.	2
	Heftige Schmerzreaktion bei Palpation.	3

Maximaler Score (Kolik): **36**

Ermittelter Score (Kolik): \_\_\_\_\_

Prozent (Kolik): \_\_\_\_\_

### **Zusätzliche Parameter bei Pferden mit Hufrehe**

<b>Parameter</b>	<b>Wert/Anzeichen</b>	<b>Score</b>
Körperhaltung	Normale Bewegungen, steht ruhig mit gleichmäßiger Gewichtsverteilung auf allen vier Gliedmaßen.	0
	Gelegentliche Gewichtsverlagerung mit zeitweiliger Entlastungshaltung, leichter Muskeltremor.	1
	Abnormale Gewichtsverteilung, entlastet eine Gliedmaße.	2

	Muskeltremor, Erschöpfung, Sägebockhaltung/ aufgekrümmter Rücken.	3
Obel Skala	Keine Abnormalitäten in der Bewegung.	0
	In Ruhe ständige Gewichtsverlagerung von einem Bein auf das andere. Keine Lahmheit im Schritt, das Pferd zeigt jedoch einen verkürzten, steifen Gang im Trab. (Obel Grad I)	1
	Pferd läuft bereitwillig im Schritt, jedoch mit einem erkennbar verkürzten und steifen Gang. Eine Gliedmaße kann ohne Probleme aufgehoben werden. (Obel Grad II)	2
	Pferd bewegt sich nur widerwillig. Eine Gliedmaße lässt sich nur schwer bis gar nicht aufheben. (Obel Grad III)	3
	Pferd verweigert die Bewegung. Läuft nur, wenn es gezwungen wird. (Obel Grad IV)	4
Pulsation der Aa. digitalis palmaris lateralis und medialis	Physiologische Pulsation.	0
	Ggr. verstärkte Pulsation.	1
	Mgr. verstärkte Pulsation.	2
	Hgr. verstärkte Pulsation.	3
Reaktion auf die Hufzange	Kein Zurückziehen der Gliedmaße.	0
	Zurückziehen der Gliedmaße, wenn starker Druck mit der Hufzange ausgeübt wird.	1
	Zurückziehen der Gliedmaße, schon bei leichtem Druck.	2
	Zurückziehen der Gliedmaße, schon bei Druckausübung lediglich mit der Hand.	3

Maximaler Score (Hufrehe): **31**

Ermittelter Score (Hufrehe): \_\_\_\_\_

Prozent (Hufrehe): \_\_\_\_

### Zusätzliche Parameter bei Pferden mit einer orthopädischen Erkrankung

Parameter	Wert/Anzeichen	Score
Körperhaltung	Normale Bewegungen, steht ruhig mit gleichmäßiger Gewichtsverteilung auf allen vier Gliedmaßen.	0
	Gelegentliche Gewichtsverlagerung mit zeitweiliger Entlastungshaltung, leichter Muskeltremor.	1
	Abnormale Gewichtsverteilung, entlastet eine Gliedmaße.	2
	Muskeltremor, Erschöpfung, Sägebockhaltung/ aufgekrümmter Rücken.	3
Grad der Lahmheit	Keine Lahmheit erkennbar. (Grad 0/5)	0
	Lahmheit ist schwierig festzustellen und ist nicht kontinuierlich erkennbar. (Grad 1/5)	1
	Auf gerader Linie in Schritt und Trab ist die Lahmheit schwierig festzustellen. Bei bestimmten Gegebenheiten ist sie aber kontinuierlich erkennbar (z.B. auf dem Zirkel, auf hartem Boden, etc.). (Grad 2/5)	2
	Lahmheit im Trab kontinuierlich erkennbar, bei allen Gegebenheiten. (Grad 3/5)	3
	Hochgradige Lahmheit, offensichtlich im Schritt. (Grad 4/5)	4
	Höchstgradige Lahmheit, nur kurzzeitige Belastung der Gliedmaße in der Bewegung und/oder in Ruhe oder komplette Entlastung der Gliedmaße. (Grad 5/5)	5
Reaktion beim Aufheben der kontralateralen Gliedmaße	Kontralaterale Gliedmaße lässt sich ohne Probleme aufheben.	0
	Kontralaterale Gliedmaße lässt sich nur schwer und für kurze Zeit aufheben.	1
	Kontralaterale Gliedmaße lässt sich überhaupt nicht aufheben.	2

Maximaler Score (orthopädische Erkrankung): **28**

Ermittelter Score (orthopädische Erkrankung): \_\_\_\_\_

Prozent (orthopädische Erkrankung): \_\_\_\_\_

## **Beurteilung der Schmerzintensität:**

Maximaler Score = 100 %

- Schmerzen nicht vorhanden: 0 - 20 %
- Geringgradige Schmerzen: 21 - 40 %
- Mittelgradige Schmerzen: 41 - 60 %
- Hochgrade Schmerzen: 61 - 80 %
- Höchstgradige Schmerzen: 81 - 100 %

### 9.3. Medikamentennachweis

1. Amoxisel-Trockensubstanz/Lösungsmittel 100 mg/ml Injektionslösung,  
Firma: Selectavet Dr. Otto Fischer GmbH, Weyarn-Holzolling, Deutschland
2. Gentacin® 85 mg/ml Injektionslösung,  
Firma: bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland
3. Flunidol® RPS 50 mg/ml,  
Firma: CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Deutschland
4. Flunidol® 5 % Gel,  
Firma: CP-Pharma GmbH, Burgdorf Deutschland
5. Heparin-Natrium Braun „Multi“ 10.000 I.E./ml Injektionslösung,  
Firma: B. Braun, Melsungen, Deutschland
6. Ringer B. Braun Spüllösung 5000 ml,  
Firma: B. Braun, Melsungen, Deutschland
7. G-40 % Glucose 400 mg/ml B. Braun Infusionslösung,  
Firma: B. Braun, Melsungen, Deutschland
8. Lidocainhydrochlorid 2 % 20 mg/ml Injektionslösung,  
Firma: bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland
9. Novaminsulfon 500 mg/ml Injektionslösung,  
Firma: Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland
10. Xylarium® 20 mg/ml Injektionslösung,  
Firma: Ecuphar GmbH, Greifswald, Deutschland
11. Dolorex® 10 mg/ml Injektionslösung,  
Firma: Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
12. Phenylbutazon-Gel PH 100 mg/ml,  
Firma: CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Deutschland

13. Phenylbutazon 20 % Injektionslösung,  
Firma: medistar GmbH, Ascheberg, Deutschland
14. Morphin-ratiopharm® 10 mg/ml Injektionslösung,  
Firma: ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
15. L-Polamivet® 2,5/0,125 mg/ml Injektionslösung,  
Firma: Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
16. GastroGard 37 % Paste,  
Firma: Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
17. Tranquisol® P 10 mg/ml Injektionslösung,  
Firma: CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Deutschland
18. Ziapam 5 mg/ml Injektionslösung,  
Firma: Ecuphar GmbH, Greifswald, Deutschland
19. Ketamidol® 100 mg/ml Injektionslösung,  
Firma: WDT, Garbsen, Deutschland
20. Isofluran CP® 1 ml/ml,  
Firma: CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Deutschland
21. Dobutamin-ratiopharm® 250 mg Trockensubstanz,  
Firma: ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland

## 9.4. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Eindimensionale Schmerzbeurteilungsskalen (MATHEWS et al. (2014)). 10
- Abb. 2:** Pferd mit abnormaler Körperhaltung und Entlastung der linken Vordergliedmaße. 41
- Abb. 3:** Serumröhrchen, Kunststoffpipette sowie Kryoröhrchen mit Serum zur Kortisolbestimmung. 44
- Abb. 4:** Platzierung der Elektroden bei der EKG-Aufzeichnung. 46
- Abb. 5:** Ergebnisse der frequenzbezogenen Analyse mittels Fast Fourier Transformation (FFT) aus der Kubios HRV Software. Die blauen Zacken repräsentieren die LF-Komponente, die gelben die HF-Komponente. 48
- Abb. 6:** Grafische Darstellung der mittleren Schmerzintensitäten der Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9) mit Schmerzen und bei der Kontrolle. Die Pferde zeigten während des Schmerzzustandes eine hochsignifikant höhere ( $p = < 0,001$ ) Schmerzintensität als bei der Kontrolluntersuchung. Der Fehlerbalken entspricht  $\pm 1$  Standardabweichung. 55
- Abb. 7:** Grafische Darstellung der mittleren ACTH 0-Werte der Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9) mit Schmerzen und bei der Kontrolle. Das gemessene ACTH 0 war während des Schmerzzustandes höher als bei der Kontrolluntersuchung. Dies war jedoch statistisch nicht signifikant. Der Fehlerbalken entspricht  $\pm 1$  Standardabweichung. 57
- Abb. 8:** Vergleich der ACTH-Basalwerte (ACTH 0) der einzelnen Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9) während des Schmerzzustandes und der Kontrolle. Davon zeigten drei Tiere (Pferd Nr. 10, 12, 15) einen niedrigeren ACTH 0-Wert während des Schmerzzustandes als bei der Kontrolluntersuchung. Die laufenden Nummern der Pferde sind als Nummerierung angegeben. 58

- Abb. 9:** Grafische Darstellung der mittleren ACTH 0- und ACTH 30-Werte der schmerzbelasteten Pferde (n = 15). Nach TRH-Applikation kam es zu einem signifikanten Anstieg von ACTH 30 (p = 0,007). Der Fehlerbalken entspricht  $\pm 1$  Standardabweichung. 59
- Abb. 10:** ACTH-Basalwerte (ACTH 0) und ACTH nach TRH-Stimulation (ACTH 30) der einzelnen schmerzbelasteten Pferde (n = 15). Bei drei Tieren (Pferd Nr. 10, 11, 13) sank der ACTH-Wert 30 Minuten nach der Applikation von TRH. 59
- Abb. 11:** Grafische Darstellung der mittleren ACTH 0- und ACTH 30-Werte der Kontrollpferde (n = 9). Nach TRH-Applikation kam es zu einem signifikanten Anstieg von ACTH 30 (p = 0,010). Der Fehlerbalken entspricht  $\pm 1$  Standardabweichung. 60
- Abb. 12:** ACTH-Basalwerte (ACTH 0) und ACTH nach TRH-Stimulation (ACTH 30) der einzelnen Kontrollpferde (n = 9). Bei allen Tieren stieg der ACTH-Wert nach TRH-Stimulation an. Die laufenden Nummern der Pferde sind als Nummerierung angegeben. 61
- Abb. 13:** Grafische Darstellung der mittleren ACTH 30-Werte der Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9) mit Schmerzen und bei der Kontrolle. Das gemessene ACTH 30 war während des Schmerzzustandes geringer als bei der Kontrolluntersuchung. Dies war jedoch statistisch nicht signifikant. Der Fehlerbalken entspricht  $\pm 1$  Standardabweichung. 62
- Abb. 14:** Vergleich der ACTH-Werte nach TRH-Stimulation (ACTH 30) der einzelnen Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9) während des Schmerzzustandes und der Kontrolle. Bei fünf Pferden (Pferd Nr. 2, 10, 11, 12, 15) wurde ein niedrigerer ACTH 30-Wert während des Schmerzzustandes als bei der Kontrolluntersuchung gemessen. Die laufenden Nummern der Pferde sind als Nummerierung angegeben. 62

- Abb. 15:** Grafische Darstellung der Mediane des ACTH-Anstiegs nach TRH-Stimulation bei den Pferden der Vergleichsgruppe (n = 9) mit Schmerzen und bei der Kontrolle. Der Anstieg des ACTHs war während des Schmerzzustandes geringer als bei der Kontrolluntersuchung. Dies war aber statistisch nicht signifikant. 63
- Abb. 16:** Die Abbildung zeigt die Schmerzintensitäten (Balken) der schmerzbelasteten Pferde mit den jeweiligen ACTH 0-Werten (Punkte). Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Schmerzintensität und der Höhe des ACTH 0-Wertes festgestellt werden. 64
- Abb. 17:** Die Abbildung zeigt die Schmerzintensitäten (Balken) der schmerzbelasteten Pferde mit den jeweiligen ACTH 30-Werten (Punkte). Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Schmerzintensität und der Höhe des ACTH 30-Wertes festgestellt werden. 65
- Abb. 18:** Grafische Darstellung der mittleren ACTH 0-Werte der Pferde der Schmerzgruppe 1 (n = 10) und Schmerzgruppe 2 (n = 5). ACTH 0 war in der Schmerzgruppe 1 höher als in der Schmerzgruppe 2. Dies war jedoch statistisch nicht signifikant. Der Fehlerbalken entspricht  $\pm 1$  Standardabweichung. 66
- Abb. 19:** Grafische Darstellung der mittleren ACTH 30-Werte der Pferde der Schmerzgruppe 1 (n = 10) und Schmerzgruppe 2 (n = 5). ACTH 30 war in der Schmerzgruppe 1 höher als in der Schmerzgruppe 2. Dies war jedoch statistisch nicht signifikant. Der Fehlerbalken entspricht  $\pm 1$  Standardabweichung. 67
- Abb. 20:** Grafische Darstellung der Mediane der Kortisol 0-Werte der Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9) mit Schmerzen und bei der Kontrolle. Das gemessene Kortisol 0 war während des Schmerzzustandes höher als bei der Kontrolluntersuchung. Dies war jedoch statistisch nicht signifikant. 70

- Abb. 21:** Vergleich der Kortisol-Basalwerte (Kortisol 0) der einzelnen Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9) während des Schmerzzustandes und der Kontrolle. Bei zwei Tieren (Pferd Nr. 2, 7) wurde ein niedrigerer Kortisol 0-Wert während des Schmerzzustandes gemessen als bei der Kontrolluntersuchung. Die laufenden Nummern der Pferde sind als Nummerierung angegeben. 70
- Abb. 22:** Die Abbildung zeigt die Mediane der Kortisol 0- und Kortisol 30-Werte der Pferde mit Schmerzen (n = 15). Nach TRH-Applikation kam es zu einem signifikanten Anstieg von Kortisol 30 (p = 0,022). 71
- Abb. 23:** Kortisol-Basalwerte (Kortisol 0) und Kortisol nach TRH-Stimulation (Kortisol 30) der einzelnen schmerzbelasteten Pferde (n = 15). Von einem Tier (Pferd Nr. 1) konnte kein Kortisol 30-Wert gemessen werden. Bei vier Tieren (Pferd Nr. 10, 11, 13, 14) sank der Kortisolwert 30 Minuten nach der Applikation von TRH. 72
- Abb. 24:** Grafische Darstellung der mittleren Kortisol 0- und Kortisol 30-Werte der Kontrollpferde (n = 9). Nach TRH-Applikation kam es zu einem signifikanten Anstieg von Kortisol 30 (p = 0,004). Der Fehlerbalken entspricht  $\pm 1$  Standardabweichung. 73
- Abb. 25:** Kortisol-Basalwerte (Kortisol 0) und Kortisol nach TRH-Stimulation (Kortisol 30) der einzelnen Kontrollpferde (n = 9). Bei einem Tier (Pferd Nr. 6) sank der Kortisolwert 30 Minuten nach der Applikation von TRH. Die laufenden Nummern der Pferde sind als Nummerierung angegeben. 73
- Abb. 26:** Grafische Darstellung der Mediane der Kortisol 30-Werte der Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9) mit Schmerzen und bei der Kontrolle. Das gemessene Kortisol 30 war während des Schmerzzustandes höher als bei der Kontrolluntersuchung. Dies war jedoch statistisch nicht signifikant. 74

- Abb. 27:** Vergleich der Kortisolwerte nach TRH-Stimulation (Kortisol 30) der einzelnen Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9) während des Schmerzzustandes und der Kontrolle. Bei drei Tieren (Pferd Nr. 2, 7, 10) wurde ein niedrigerer Kortisol 30-Wert während des Schmerzzustandes gemessen als bei der Kontrolluntersuchung. Die laufenden Nummern der Pferde sind als Nummerierung angegeben. 75
- Abb. 28:** Die Abbildung zeigt die Schmerzintensitäten (Balken) der schmerzbelasteten Pferde mit den jeweiligen Kortisol 0-Werten (Punkte). Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Schmerzintensität und der Höhe des Kortisol 0-Wertes festgestellt werden. 76
- Abb. 29:** Die Abbildung zeigt die Schmerzintensitäten (Balken) der schmerzbelasteten Pferde mit den jeweiligen Kortisol 30-Werten (Punkte). Für Pferd Nr. 1 wurde kein Kortisol 30-Wert gemessen. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Schmerzintensität und der Höhe des Kortisol 30-Wertes festgestellt werden. 77
- Abb. 30:** Grafische Darstellung der Mediane der Kortisol 0-Werte der Pferde der Schmerzgruppe 1 (n = 10) und Schmerzgruppe 2 (n = 5). Kortisol 0 war in der Schmerzgruppe 1 höher als in der Schmerzgruppe 2. Dies war jedoch statistisch nicht signifikant. 78
- Abb. 31:** Grafische Darstellung der Mediane der Kortisol 30-Werte der Pferde der Schmerzgruppe 1 (n = 10) und Schmerzgruppe 2 (n = 4). Von einem Pferd aus der Schmerzgruppe 2 konnte kein Kortisol 30 gemessen werden. Insgesamt war Kortisol 30 in der Schmerzgruppe 2 höher als in der Schmerzgruppe 1. Dies war jedoch statistisch nicht signifikant. 79
- Abb. 32:** Mittlere LF- und HF-Leistung der Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9) mit Schmerzen und bei der Kontrolle. Während des Schmerzzustandes kam es zu einem Anstieg der LF- und einem Abfall der HF-Komponente. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Der Fehlerbalken entspricht  $\pm 1$  Standardabweichung. 81

- Abb. 33:** Grafische Darstellung der Mediane der LF/HF-Ratio bei den Pferden der Vergleichsgruppe (n = 9) mit Schmerzen und bei der Kontrolle. Die LF/HF-Ratio war während des Schmerzzustandes signifikant höher als bei der Kontrolluntersuchung ( $p = 0,028$ ). 82
- Abb. 34:** Grafische Darstellung der mittleren LF- und HF-Leistungen der Pferde der Schmerzgruppe 1 (n = 10) und Schmerzgruppe 2 (n = 5). In der Schmerzgruppe 1 war die LF-Komponente höher und die HF-Komponente niedriger als in Schmerzgruppe 2. Dies war jedoch statistisch nicht signifikant. 84
- Abb. 35:** Grafische Darstellung der Mediane der LF/HF-Ratio der Pferde der Schmerzgruppe 1 (n = 10) und Schmerzgruppe 2 (n = 5). Die LF/HF-Ratio war in der Schmerzgruppe 1 höher als in der Schmerzgruppe 2. Dies war jedoch statistisch nicht signifikant. 85

## 9.5. Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b>	Beschreibungen der vier Obel Grade zur Kategorisierung der Hufrehe-assoziierten Lahmheit, angepasst nach STASHAK (1989).	11
<b>Tab. 2:</b>	Die verschiedenen Zelltypen der Pars distalis und ihre Hormone.	17
<b>Tab. 3:</b>	Allgemeiner Teil der Schmerzskala.	40
<b>Tab. 4:</b>	Daten der untersuchten schmerzbelasteten Pferde (n = 15).	52
<b>Tab. 5:</b>	Herzfrequenzen der Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9).	54
<b>Tab. 6:</b>	Atemfrequenzen der Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9).	54
<b>Tab. 7:</b>	Innere Körpertemperatur der Pferde der Vergleichsgruppe (n = 9).	54
<b>Tab. 8</b>	Mittelwerte ( $\pm$ Standardabweichung) der Blutparameter der Vergleichsgruppe (n = 9).	56
<b>Tab. 9:</b>	Median sowie Minimum- und Maximumwert von ACTH 0 in den verschiedenen Krankheitsgruppen.	68
<b>Tab. 10:</b>	Median sowie Minimum- und Maximumwert von ACTH 30 in den verschiedenen Krankheitsgruppen.	68
<b>Tab. 11:</b>	Median sowie Minimum- und Maximumwert von Kortisol 0 in den verschiedenen Krankheitsgruppen.	80
<b>Tab. 12:</b>	Median sowie Minimum- und Maximumwert von Kortisol 30 in den verschiedenen Krankheitsgruppen.	80
<b>Tab. 13:</b>	Median sowie Minimum- und Maximumwert der LF-Leistung in den verschiedenen Krankheitsgruppen.	85
<b>Tab. 14:</b>	Median sowie Minimum- und Maximumwert der HF-Leistung in den verschiedenen Krankheitsgruppen.	86

<b>Tab. 15:</b>	Median sowie Minimum- und Maximumwert der LF/HF-Ratio in den verschiedenen Krankheitsgruppen.	86
<b>Tab. 16:</b>	Frequenzbezogene Parameter der HFV des Ponys mit Verdacht auf PPID während des Schmerzzustandes und der Kontrolluntersuchung.	114

## **9.6. Publikationsliste**

GEHLEN, H., JABURG, N., MERLE, R., WINTER, J. (2020)

“Can Endocrine Dysfunction Be Reliably Tested in Aged Horses That Are Experiencing Pain?”

Animals **10**(8): 1426

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Heidrun Gehlen, die mir dieses interessante Thema bereitgestellt hat. Insbesondere möchte ich mich für die ausgezeichnete Betreuung während der gesamten Zeit und für die Bereitstellung der benötigten Mittel bedanken.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Roswita Merle für ihre kompetente und freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Auch dem ganzen Team der Pferdeklinik der FU Berlin möchte ich für die großartige Hilfe während des praktischen Versuchsteils und während meiner Zeit als Intern danken.

Dem Labor Synlab.vet in Berlin danke ich für die zuverlässige Bearbeitung der Proben und die problemlose Befundübermittlung.

Ohne meine Mitdoktorandinnen und fantastischen Freundinnen Maike Walther, Katja Klein und Sarah Liertz wäre diese Zeit undenkbar gewesen. Ich danke euch für eure Motivation, euren Rat und die unvergesslichen Abende.

Ein ganz großer Dank gilt auch meinem wunderbaren Freund Ted Tettey. Dafür, dass ich seinen Esstisch für Monate ins Chaos stürzen dürfte, für sein Verständnis und seine Unterstützung

Meinen Eltern Sonja und Thomas Jaburg sowie meiner Schwester Lisa Jaburg möchte ich meinen größten Dank aussprechen. Mein ganzes Leben haben sie mich bei allem unterstützt und mich in jedem Vorhaben bekräftigt. Auch während der Verfassung dieser Arbeit standen sie mir mit ihrer geduldigen und liebevollen Art zur Seite, auch wenn es mal nicht so gut voran ging.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 04. September 2020

Nina Jaburg









9 783967 290745

**mbv**berlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-074-5