

162. Zanella, A.J. and Broom D.M. 1993. Endogene Opiode und Indikatoren für tierschutzrelevante Anpassungsvorgänge. In *Aktuelle Arbeiten zur artgemässen Tierhaltung* Schrift 356, 116-126, Darmstadt: K.T.B.L.

Endogene Opiode und Indikatoren für tierschutzrelevante Anpassungsvorgänge

A.J. ZANELLA und D.M. BROOM

1 Einleitung

Die Klärung, ob und inwieweit Opiode an Adaptationsmechanismen des Organismus beteiligt sind, und deshalb als Indikatoren für die Tiergerechtheit eines Haltungssystems genutzt werden können, kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Dabei ist es eine vorrangige Forderung, sich von überhöhten Vorstellungen und unwissenschaftlichen Ideen zu lösen, was eigentlich "tiergerechte Haltung" bedeutet. Es ist besorgniserregend, so viele verfälschte Behauptungen zu hören, die manipulierte Informationen über das enthalten, was über den Gemütszustand eines Tieres wirklich bekannt ist. Gedankliche Basis der vorliegenden Arbeit ist die Definition BROOMS (1986), der "Wohlbefinden" (welfare) als den Zustand eines Individuums beschreibt, "unter Berücksichtigung seiner Anstrengungen mit der Umwelt zurechtzukommen". Wenn wir den entsprechenden Begriff "Indikatoren für tiergerechte Haltung" verwenden, meinen wir physiologische Indikatoren in Kombination mit Verhaltensindikatoren.

Einige Verhaltensindikatoren für schlechtes Wohlbefinden sowie für schlechte Haltungsbedingungen sind z.B. Verhaltensstörungen als Folge des nicht artgemässen Bewegungsbedarfs bei Schweinen:

- stereotypes Verhalten: wiederholte, unveränderte Verhaltensweisen ohne offensichtliches Ziel oder Funktion (z.B. Leerkauen, Stangenbeißen und Zungenrollen; Abb. 1, 2 und 3);
- Inaktivität;
- Gleichgültigkeit (VAN PUTTEN 1980; BROOM und POTTER 1984).

Auch Opiode können Hinweise auf Anpassungsvorgänge geben. Sie sind unter verschiedenen Lebensbedingungen und -situationen wichtig, beispielsweise bei der Schmerzmodulation, der motorischen Aktivität, beim Lernen und der Erinnerung, bei Aggressionen, der Reproduktion, bei Stress, der Immunantwort, der Aver-sion und Zurechtfinden der Belohnung und der Freude.



Abb. 1: Stereotypes Leerkauen einer Sau bei Stallhaltung
Stam-chewing stereotypy in a stall housed sow



Abb. 2: Vier Bewegungen einer Sau bei Stallhaltung, während des stereotypen Stangenbeißens beobachtet
Four movements observed during a bar-biting stereotypy in a stall housed sow

Es gibt drei Opioidgruppen mit bekannten endogenen Liganden:

- μ -Rezeptoren, die β -Endorphin und Met- und Leu-Enkephalin (endogene Liganden) binden;
- δ -Rezeptoren, die vorrangig Met- und Leu-Enkephalin und β -Endorphin (endogene Liganden) binden;
- κ -Rezeptoren, die Dynorphin (endogener Ligand) binden.



Abb. 3: Stereotypes Zungenrollen einer Sau bei Stallhaltung
Tongue-rolling stereotypy in a stall housed sow

Opioidreaktionen können über die Beobachtung des Konzentrationspiegels von Opioidpeptiden im peripheren Blut oder in der Cerebrospinalflüssigkeit beurteilt werden.

Ein anderer Ansatz, Informationen über Opioidreaktionen zu erhalten, ist mittels pharmakologischer Manipulation möglich: entweder durch die Blockade spezifischer Rezeptoren mit Antagonisten oder durch die Stimulation dieser Rezeptoren mit den passenden Agonisten.

Die Kritikpunkte dieser zwei Annäherungsversuche sind gut bekannt:

Die Konzentrationspiegel der endogenen Opioidide im peripheren Blut können nichts über Schwankungen ihres zentralen Konzentrationsniveaus aussagen;

die meisten endogenen Opioidide können die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden. Ihre Funktion in den peripheren Geweben ist verschiedenartig und meistens völlig unbeflüßt von ihrem Reaktionsverhalten im zentralen Nervensystem.

Die Konzentrationspiegel von Peptiden im peripheren Blut unterliegen zirkadianen Rhythmen. Sie werden zudem von der Jahreszeit, individuellen Eigenheiten und dem Reproduktionsstatus beeinflusst.

Die Reaktion auf einen Antagonisten ist von der Spezifität des eingesetzten pharmakologischen Stoffes abhängig. Eine Substanz kann sich situationsgebunden bei bestimmten Konzentrationen wie ein spezifischer Antagonist, bei ansteigenden Dosen jedoch auch andersartig verhalten. Naloxon zum Beispiel, ein klassischer Opioidantagonist, kann μ -, δ - und κ -Rezeptoren dosisabhängig blockieren.

Agonisten sind normalerweise auf Dosierungen geprüft, die weitgehend über die physiologischen Niveaus hinausgehen. Die Interpretation der durch pharmakologische Manipulationen gewonnenen Daten muß mit Vorsicht vorgenommen werden.

Die Reaktionen eines Tieres auf einen Agonisten oder Antagonisten ist auch von seinem physiologischen Status abhängig.

Um mehr und präzisere Informationen über die Opioidreaktionen zu erhalten, wurden die Zellmembranrezeptoren für μ -, δ - und κ -Agonisten, die eine spezifische Bindung für die drei bekanntesten Gruppen von endogenen Opioiden zeigten, in den Gehirnregionen quantifiziert und charakterisiert. Opioidrezeptoren sind labil und können durch Streß, verursacht beispielsweise durch Bewegungs- einschränkung, elektrische Reizung des Fußes und soziale Isolation, beeinflusst werden (ZEMMAN et al. 1988; NABESHIMA et al. 1985).

Hohe Niveaus von endogenen Substanzen verursachen eine rückregulierte Abnahme der spezifischen Rezeptoren. Niedrigere Konzentrationsniveaus rufen demgegenüber einen Anstieg in der Anzahl der Zellmembranrezeptoren hervor, falls eine Homöostase erreicht wird. Diese Technik ist sehr wirkungsvoll, weil so Veränderungen, die in einer spezifischen Region stattfinden, identifiziert werden können und so einen Langzeitprozeß widerspiegeln.

2 Versuch

Aus einer Gruppe von 350 Sauen in Anbindehaltung eines kommerziellen landwirtschaftlichen Betriebs wurden 20 Sauen ausgewählt. Die Sauen wurden gegen Ende ihrer Trächtigkeit beobachtet. Videoaufnahmen und direkte Beobachtung wurden als Untersuchungstechniken eingesetzt (MARTIN und BATESON 1986). Während drei Tagen wurden 145 Momentaufnahmen in direkter Beobachtung und mehr als 150 aus einer 24-stündigen Videoaufnahme gesammelt. Fünf Tage nach dem Absetzen (nach 21 Tagen) wurden 7 Sauen geschlachtet und ihre Gehirne unmittelbar nach der Tötung entnommen und bei -70 °C aufbewahrt (Abb. 4).

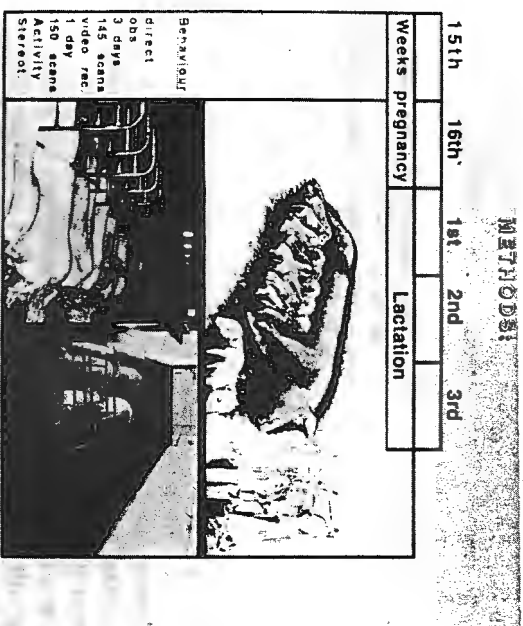


Abb. 4: Eingesetzte Methoden für Opioidrezeptoren-Versuche
Methods used for opioid receptor experiments

Die Proben der Frontalcortex und des Caudatum wurden für Studien homogener Bindungen (HUNTER et al. 1989) benutzt. Für die Autoradiographie wurden Gehirnschnitte auf beschichtete Glasobjektträger präpariert, mit den spezifischen Liganden über einen Zeitraum von 14 bis 16 Wochen inkubiert und auf einen für Tritium empfindlichen Film übertragen (ZANELLA 1992). Als mit Tritium markierte Liganden wurden DagoI (μ -Agonist), DPDPE (δ -Agonist) und CI977 (κ -Agonist) eingesetzt.

Vier Sauen aus der Gruppenhaltung wurden als Vergleichstiere in die Untersuchung miteinbezogen, ohne jedoch Verhaltensdaten von ihnen zu erfassen.

Die Daten der direkten Beobachtung und der Videoaufnahmen wurden getrennt ausgewertet. Die beiden Datensätze erbrachten ähnliche Ergebnisse, so daß für weitere Untersuchungen die Daten kombiniert wurden. Die Verhaltensdaten wurden als Prozentsatz am Gesamtspektrum aller Verhaltensweisen ausgedrückt. Die Rezeptorbindungsdaten wurden mit dem Programm LIGAND (MUNSON und RODBARD 1980) ausgewertet.

3 Ergebnisse

Die homogene Bindung zeigte, daß der Hypothalamus die höchsten Dichten von μ -Rezeptoren hatte, gefolgt von Caudatum und Frontalcortex, wobei signifikante Unterschiede in der Bindung zwischen Frontalcortex und Caudatum bestanden (Mittelwert $x - y = -21,79$; $t = -3,69$; $p = 0,0047$). Das Caudatum hatte eine signifikant höhere δ -Rezeptordichte (Mittelwert $x - y = -13,35$; $t = -4,15$; $p = 0,02$). Die κ -Rezeptordichte war im Hypothalamus niedriger, wogegen keine signifikanten Unterschiede zwischen Frontalcortex und Caudatum gefunden wurden (Tab. 1).

Tab. 1: Durchschnittliche maximale Bindungskapazität (B_{max}) für [3 H]DagoI, [3 H]DPDPE und [3 H]CI977. Die Daten wurden aus Studien homogener Bindungen für drei Gehirnregionen von ausgewachsenen Sauen ermittelt (die Hypothalamusdaten wurden aus Sammelproben gewonnen)
Mean maximum binding capacity (B_{max}) for [3 H]DagoI, [3 H]DPDPE and [3 H]CI977. Data were obtained in homogeneous binding studies for three brain areas of adult sows (hypothalamus data: was obtained using pooled samples)

Bindungskapazität binding capacity	[3 H]DagoI			[3 H]DPDPE			[3 H]CI977		
	μ -agonist fmols/mg prot.	δ -agonist fmols/mg prot.	κ -agonist fmols/mg prot.	μ -agonist fmols/mg prot.	δ -agonist fmols/mg prot.	κ -agonist fmols/mg prot.	μ -agonist fmols/mg prot.	δ -agonist fmols/mg prot.	κ -agonist fmols/mg prot.
Bmax Cortex	23,79 \pm 2,28	31,99 \pm 2,19	36,86 \pm 3,94						
Bmax Caudatum	45,59 \pm 4,59	45,34 \pm 3,89	42,87 \pm 4						
Bmax Hypothalamus	62,0 \pm 8,4		24,3 \pm 2,45						

Vier von den sieben Sauen in Anbindehaltung zeigten während der Beobachtungszeit ein eindeutiges stereotypes Zungenrollen.

Leerkauen wurde bei allen sieben Sauen in verschiedener Häufigkeit, variierend von 2,1 bis 19,7 % festgestellt.

Der Zeitraum, während dem sich die Sauen inaktiv verhielten, variierte unter den Tieren von 26 bis 83 % der Beobachtungszeit.

Die drei eingesetzten Liganden zeigten durchweg niedrigere Werte der maximalen Bindungskapazität (B_{max}) für Sauen aus Gruppenhaltung, erreichten aber wegen der großen Variation zwischen den Sauen keine Signifikanz. Im Gegensatz dazu waren die einzigen signifikanten Veränderungen in B_{max} verbunden mit der Hal- tungstform in der $[3H]Dagol$ -Bindung an die Frontalcortex zu erkennen. In Grup- pen gehaltene Sauen ($n = 4$) hatten signifikant niedrigere B_{max} für $[3H]Dagol$ (μ - Agonist) in der Frontalcortex ($15,98 \pm 1,16$ und $28,26 \pm 2,0$ fmoleles/mg Pro- tein; $t = 4,28$; $df = 9$; $p = 0,002$) als die Sauen aus der Anbindehaltung ($n = 7$).

Der Prozentsatz der Beobachtungszeit, in dem sich die Sauen inaktiv verhielten, war positiv korreliert mit der $[3H]Dagol$ -Bindung an die Frontalcortex bei Sauen in Anbindehaltung ($r_s = 0,893$; $p = 0,028$). Das läßt auf eine Verbindung zwi- schen dem Aktivitätsniveau und den μ -Rezeptoren schließen.

Die gesamte Häufigkeit von Stereotypen, die bei jeder Sau auftraten, wurde durch Summenbildung aus den Einzeldaten für Zungenrollen und Leerkauen be- rechnet.

Die $[3H]CI977$ -Bindung an die Frontalcortex war invers korreliert mit dem Aus- führen von Stereotypen: Zungenrollen und Leerkauen ($r_s = -0,964$; $p = 0,0182$). Das könnte ein Hinweis sein, daß die k -Rezeptorenregulation durch en- dogene Mechanismen mit dem Auftreten von Stereotypen in Verbindung steht (Abb. 5).

Der δ -Agonist $[3H]DPE$ ließ sich nicht mit einer Verhaltensweise, die in dieser Untersuchung berücksichtigt wurde, in Verbindung setzen.

Es waren in dieser Studie auch keine Veränderungen der Rezeptorstellen im Cau- datum nucleu, abhängig von Haltungsbedingungen und Verhaltensweisen, fest- stellbar.

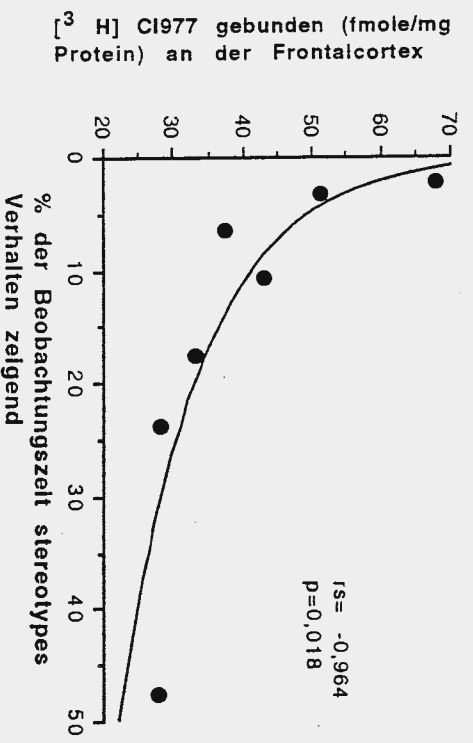


Abb. 5: Beziehungen zwischen den gesamten Stereotypen (Zungenrollen und Leer- kauen) und der $[3H]CI977$ -Bindung (k -Agonist) an die Schweinefrontalcortex. Relationship between total stereotypies (tongue-rolling and sham-chewing) and $[3H]CI977$ (k -agonist) binding to the pig frontal cortex

4 Diskussion

Die Vielfalt der Bindungsprofile, die von den μ -, δ - und k -Liganden in den unter- suchten Gehirnregionen aufgezeigt wurden, stehen im Widerspruch zu Arbeiten, welche eine Beziehung zwischen Opioidreaktionen und Indikatoren für schlechte Haltungsbedingungen auf Grundlage der Verhaltensantwort auf Naloxon postu- liert (CRONIN et al. 1985). COHEN et al. (1983) zeigte beim Menschen eine do- sisabhängige Antwortreaktion auf eine Naloxoninjektion unter Bedingungen von Anspannung, Sorgen, Ärger, Feindseligkeit, Verwirrung, Depression und Erstaun- nen.

In der vorliegenden Arbeit war bei Sauen die Dichte der Opioidrezeptoren signifi- kant korreliert mit Indikatoren schlechter Haltungsbedingungen und Haltungsart, wie z.B. in Form von Inaktivität und Stereotypen.

Wir unterstellen, daß diese Ergebnisse eine Rezeptormodulation widerspiegeln, ausgelöst von einem Wechsel der zentralnervösen Konzentrationsniveaus der endogenen Liganden. Im Falle einer Stereotypie kann es mit einem Anstieg des endogenen k -Liganden einhergehen. Andererseits haben Sauen in Anbindehal- tung möglicherweise abnehmende zentrale Konzentrationsniveaus der μ -Ligan- den.

Eine weitere Erforschung der Beteiligung von Dopamin bei Stereotypen und seine Interaktionen mit Opioidrezeptoren sollte erwogen werden, weil Opioidrezeptoren an dopaminergen Neuronen vorhanden sind. Die Aktivierung der Opioidrezeptoren kann, wie gezeigt, die Dopaminausschüttung modifizieren (BRODERICK et al. 1984; CANCELA et al. 1984).

Die negative Beziehung zwischen κ -Rezeptoren und Stereotypen ist für die Erforschung des tierischen Wohlbefindens von großem Interesse: bekannte Ergebnisse bei anderen Tierarten legen nahe, daß κ -Agonisten eine "konditionierte Ortsaversion" hervorrufen und von Ratten und Rhesusaffen nicht selbst geregelt werden (BECHARA und VAN DER KOY 1987; DYKSTRA et al. 1987).

Sauen in Anbindehaltung hatten eine signifikant höhere Dichte von μ -Rezeptoren. Bei Ratten und Rhesusaffen rufen μ -Agonisten eine "konditionierte Ortspräferenz" hervor und werden von den Tieren selbst geregelt (BECHARA und VAN DER KOY 1987; DYKSTRA et al. 1987).

Das limbische System, das bekanntermaßen in das emotionelle Geschehen beim Menschen eingebunden ist, zeigt eine spezifische Bindung für diese drei Opioidgruppen (μ , δ und κ).

Warum sind Opioidrezeptoren beim Schwein in den gleichen anatomischen Regionen vorhanden, welche beim Menschen das emotionale Verhalten modulieren? Die Antwort auf diese Fragestellung kann zu der fortlaufenden Diskussion über die Kontinuität zwischen Mensch und anderen Spezies in Beziehung zu Emotionen einen wissenschaftlichen Beitrag leisten.

5 Literaturverzeichnis

- BECHARA, A. und VAN DER KOY, D.: κ receptors mediate the peripheral aversive effects of opiates. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 28 (1987), S. 227 - 233
- BRODERICK, P.A.; GARDNER, E.L. und VAN PRAAG, H.M.: In vivo electrochemical and behavioral evidence for specific neural substrates modulated differentially by enkephalin in rat stimulant stereotypy and locomotion. *Biol. Psychiatry* 19 (1984), S. 45 - 54
- BROOM, D.M.: Indicators of poor welfare. *Br. Vet. J.* 142 (1986), S. 524 - 526
- BROOM, D.M. und POTTER, M.J.: Factors affecting the occurrence of stereotypies in stall-housed dry sows. In: UNSHELM, J.; VAN PUTTEN, G. und ZEEB, K. (Eds.): *Proc. Int. Cong. Appl. Ethol. Farm. Animal Kiel 1984*. Darmstadt, KTBL, 1984, S. 229 - 231

CANCELA, L.M.; ARTINIAN, J. und FULGINITI, S.: Effect of naloxone on amphetamine induced release of dopamine and noradrenaline from central catecholaminergic neurons. *Commun. Biol.* 3 (1984), S. 241 - 248

COHEN, M.R.; COHEN, R.M.; DICKOR, D.; WEINGARTNER, H. und MURPHY, D.L.: High dose naloxone infusions in normals. *Arch. Gen. Psych.* 40 (1983), S. 613 - 619

CRONIN, G.M.; WIEPKEMA, R.P. und VAN REE, J.M.: Endogenous opioids are involved in abnormal stereotyped behaviours of tethered sows. *Neuropeptides* 6 (1985), S. 527 - 530

DYKSTRA, L.A.; GMERER, D.E.; WINGER, G. und WOODS, J.H.: κ opioids in Rhesus monkeys I. Diuresis, sedation, analgesia and discriminative stimulus effects. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 242 (1987), S. 413 - 420

HUNTER, J.C.; BIRCHMORE, B.; WOODRUFF, R. und HUGHES, J.: κ opioid binding sites in the dog cerebral cortex and spinal cord. *Neuroscience* 31 (1989), S. 735 - 743

MARTIN, P. und BATESON, P.B.: *Measuring Behaviour, an introductory guide*. Cambridge, Cambridge University Press, 1986

MUNSON, P.J. und ROBBARD, D.: LIGAND: A Versatile Computerized Approach for Characterization of Ligand-Binding Systems. *Anal. Bioch.* 107 (1980), S. 220 - 239

NABESHIMA, T.; MATSUNO, K. und KAMEYAMA, T.: Involvement of the different opioid receptors subtypes in electric shock-induced analgesia and motor suppression in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 114 (1985), S. 197 - 207

VAN PUTTEN, G.: Objective Observations on the behaviour of fattening pigs. *Anim. Regul. Stud.* 3 (1980), S. 105 - 118

ZANELLA, A.J.: μ , δ and κ binding sites in the pig brain, adrenals and pituitary. *J. Anim. Sci.* 70 (1992), suppl. 1

ZEMAN, P.; ALEXANDROVA, M. und KVETNANSKY, R.: Opioid μ δ and dopamine receptor numbers in rat striatum during stress. *Endocrinol. Exp. (Bratisl.)* 22 (1988), S. 59 - 66

Danksagung

Vielen Dank dem Brasilianischen Forschungsrat (CNPq) für das bereitgestellte Stipendium für A.J. Zanella, dem Parke Davis Neuroscience Research Centre für die bereitgestellten Laboreinrichtungen und die technische Unterstützung, Herrn David Overton für die Erlaubnis in seinem landwirtschaftlichen Betrieb die

Versuche durchzuführen, Prof. Dr. J. Unshelm und Dr. S. Platz für Anmerkungen zu einem früheren Entwurf dieser Veröffentlichung und Frau P. Brunner für die Übersetzung.

Summary

Endogenous opioids and indicators of poor welfare in sows

A. J. ZANELLA AND D. M. BROOM

The density and affinity of μ -, δ - and κ -receptors were assessed in brains of sows housed in groups or tethered during pregnancy. Behaviour indicators of poor welfare (eg. inactivity and stereotypies) were measured and their relationships with the binding profile of opioid agonists were assessed. Areas of the limbic system (eg. amygdala and hippocampus) showed specific binding for μ -, and κ -agonists. Sows kept in tether-stalls had higher densities of μ -receptor in the frontal cortex than sows housed in groups. The percentage of observation time when the sows were inactive was positively correlated with μ -receptor density in the frontal cortex. The percentage of time during which individual sows engaged in stereotypies (tongue rolling and sham-chewing) was negatively correlated with κ -receptor density in the frontal cortex.