



LEIBNIZ-INSTITUT
FÜR NUTZTIERBIOLOGIE

Abschlussbericht: QS-Wissenschaftsfonds

Untersuchung und Bewertung von Haarcortisol als retrospektiver Bioindikator für Belastungen beim Schwein

Laufzeit des Projekts: 01.05.2017 – 31.03.2019

Dr. Winfried Otten

Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN)

Institut für Verhaltensphysiologie

Wilhelm-Stahl-Allee 2

18196 Dummerstorf

Inhaltsverzeichnis

1.	Hintergrund, Problemstellung und Stand der Forschung.....	3
2.	Aufgabenstellung und Ziele des Vorhabens	4
3.	Ablauf der Forschungsarbeiten sowie wissenschaftlich-technische Ergebnisse.....	4
3.1	Etablierung eines Methodenprotokolls zur Probengewinnung, -aufbereitung und Analytik	4
3.2	Aufklärung zum Einfluss verschiedener Variationsfaktoren	5
3.3	Validierung als retrospektiver Indikator für Stressbelastungen.....	9
4.	Zusammenfassung und Ausblick	14
5.	Fachbeiträge, Fachpublikationen	15
6.	Literaturliste	16

1. Hintergrund, Problemstellung und Stand der Forschung

Stressbelastungen eines Organismus gehen einher mit der Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) wodurch es zur tierartspezifischen Freisetzung der Glucocorticoid (GC)-Hormone Cortisol oder Corticosteron kommt. Während gelegentliche und akute Aktivierung der HPA-Achse zur normalen Adaptation des Organismus an Stresssituationen gehört, sind kumulative und chronische Belastungen durch häufige oder langfristige Veränderungen der basalen GC-Sekretion mit einer Reihe von Gesundheitsstörungen verbunden (Chrousos and Kino, 2007). Dadurch eignen sich Aussagen über die Langzeitsekretion von GC und über die Abweichung von Referenzbereichen als Biomarker für psychische und physische Belastungen (Novak et al., 2013). GC-Messungen bei Tieren zur Bewertung von Stressbelastungen erfolgten bisher in Blut-, Speichel-, Urin- oder Kotproben und reflektieren daher akute Werte bis zu einem Zeitraum von circa einem Tag. Sie unterliegen einer Reihe von Einflussfaktoren wie z.B. Tagesrhythmus, akutem Stress (der u.a. auch durch Probennahme erzeugt worden sein kann), Futteraufnahme und körperlicher Aktivität. Die Messung von Stressbelastungen über längere Zeiträume muss durch wiederholte und aufwendige Probeentnahmen abgedeckt werden. Die Analyse von GC in Haaren könnte demgegenüber eine innovative, nicht-invasive und einfache Methodik darstellen, um die Langzeitsekretion von GC zu messen.

Die Aussagekraft von Haarcortisolkonzentrationen und die Beziehung zu wiederholten Messungen im Speichel, Blut, Urin oder Kot wurden bei Katzen, Hunden, Primaten und beim Menschen durch signifikante Korrelationen nachgewiesen (Stalder und Kirschbaum, 2012). Die Eignung von Haarcortisol als Biomarker für vorausgegangene Stresssituationen konnte bei Primaten (Davenport et al., 2008; Fairbanks et al., 2011; Dettmer et al., 2012) und beim Menschen belegt werden (Kalra et al., 2007; Yamada et al., 2007; Van Uum et al., 2008; Dettenborn et al., 2010). Darüber hinaus kann Haarcortisol beim Menschen ein Biomarker für das Auftreten von psychischen Störungen sein (Dowlati et al., 2010; Dettenborn et al., 2012; Steudte et al., 2011). Untersuchungen beim Menschen zeigten außerdem, dass die Einlagerung von Cortisol in das wachsende Haar eine retrospektive Reflektion der integrierten Cortisolsekretion über mehrere Monate erlaubt (Stalder und Kirschbaum, 2012; Russell et al., 2012).

Untersuchungen an landwirtschaftlichen Nutztieren weisen ebenfalls darauf hin, dass auch beim Schwein (Bacci et al., 2014), Rind (González-de-la-Vara et al., 2011; Moya et al., 2013; Burnett et al., 2015; Tallo-Parra et al., 2015) und Schaf (Ghassemi Nejad et al., 2014) Cortisolbestimmungen in Haaren möglich sind. Beim Rind konnte bereits auch die Korrelation von Haarcortisolgehalten mit Cortisolkonzentrationen in Speichel und Kot nachgewiesen werden (Moya et al., 2013; Tallo-Parra et al., 2015).

2. Aufgabenstellung und Ziele des Vorhabens

Dieses durch den QS-Wissenschaftsfonds geförderte Projekt war ein ergänzender Teil zu einem größeren Verbundprojekt mit dem Thema „Etablierung und Validierung des Glucocorticoidnachweises in Haaren und Federn zum nicht-invasiven Monitoring für Tierwohl in verschiedenen Nutztierspezies“ (gefördert durch die BLE). Es war die Zielsetzung, den Haarcortisolgehalt beim Schwein als einen möglichen Indikator für vorausgegangene Stressbelastungen zu validieren. Für diesen Zweck wurde ein Methodenprotokoll zur Probengewinnung in der Praxis und zur anschließenden Analytik erarbeitet. Nach der Aufklärung tierbasierter, saisonaler und haarspezifischer Variationsfaktoren wurde die retrospektive Aussage des Indikators über den Schweregrad und die Langfristigkeit von vorausgegangenen Stressbelastungen der Tiere in experimentellen und praxisrelevanten Haltungssituationen untersucht.

3. Ablauf der Forschungsarbeiten sowie wissenschaftlich-technische Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Methodenprotokolls zur Probengewinnung, -aufbereitung und Analytik

Basierend auf einer Methodenbeschreibung bei Primaten (Meyer et al., 2014) wurde eine Methodik zum Cortisolnachweis in Haaren von Schweinen erarbeitet. Vortestungen der Analytik umfassten Untersuchungen zu folgenden Einflussfaktoren: eingesetzte Haarmasse, Waschmethode, Pulverisierung, Extraktion (Lösungsmittel, Volumen, Dauer, Temperatur, Schüttelfrequenz), Prozess des Eindampfens, Rekonstitution und Cortisol-ELISA. Als Ergebnis dieser Testungen konnte ein Methodenprotokoll etabliert werden, welches für die Cortisolbestimmungen in den nachfolgenden Untersuchungen zum Einsatz kam.

Dazu wurden Haarproben zweimalig mit Isopropanol gewaschen, um äußere Verunreinigungen zu entfernen. Nach dem Trocknen erfolgte die Pulverisierung der Probe mit einer Kugelmühle. Die Extraktion von Cortisol wurde mit Methanol durchgeführt und die Bestimmung erfolgte mittels Enzymimmunoassay (Demeditec, Kiel). Für diese analytische Methode wurden Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten von 5,6% und 6,2% ermittelt, welche eine gute Reproduzierbarkeit der Methodik belegen (für Details siehe Heimbürge et al., 2020a; 2020b).

3.2 Aufklärung zum Einfluss verschiedener Variationsfaktoren

In diesem Arbeitspaket erfolgten Untersuchungen zum Einfluss tierbasierter, saisonaler und haarspezifischer Faktoren auf den Cortisolgehalt im Haar von Schweinen. Dazu wurden die Wachstumsgeschwindigkeit und der Cortisolgehalt der Haare an verschiedenen, zur Entnahme geeigneten Körperregionen ermittelt. Dies dient zum einen der Identifizierung einer bestmöglich für eine einfache Probenentnahme geeigneten Region. Außerdem liefert die Wachstumsgeschwindigkeit Information über die Zeitspanne, in der eine Belastung retrospektiv in den Haaren nachweisbar ist. Durch die einzelne Betrachtung verschiedener Segmente der Haare und dem Wissen der Wachstumsgeschwindigkeit könnte darüber hinaus die Untersuchung einzelner Zeitabschnitte möglich sein. Weiterhin wurden mögliche saisonale, alters-, geschlechts- und trächtigkeitsabhängige Einflüsse auf die basalen Haarcortisolkonzentrationen untersucht, um eventuell notwendige Standardisierungen beim Vergleich von Tieren und Tiergruppen vornehmen zu können.

Der Einfluss von Körperregion (Abb. 1), Alter des Haares und Trächtigkeit/Laktation wurde an Sauen (Deutsche Landrasse) in der Experimentalanlage des FBN untersucht. Haarproben für die Faktoren Saison, Alter und Geschlecht wurden bei Sauen (Landrasse x Large White) und ihren Nachkommen aus dem Bestand eines Praxispartnerbetriebs gewonnen.

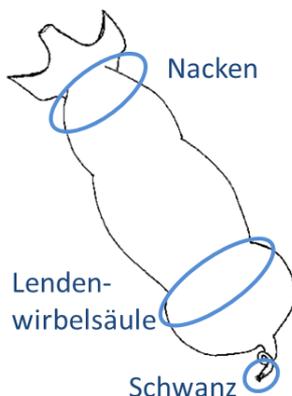


Abb. 1: Körperregionen zur Haarprobenentnahme und Untersuchung der Wuchsgeschwindigkeit

3.2.1 Ergebnisse

Unsere Untersuchungen zeigen, dass beim Schwein die Haarrasur im Bereich des hinteren Rückens (Lendenwirbelsäule) am besten toleriert wird und daher für die Haarprobenentnahme am praktikabelsten ist (Abb. 1). Diese Region wurde daher als Standardentnahmeregion für die Haarentnahme in den weiteren Versuchen ausgewählt. Durch Farbmarkierung des Haarschafts an der Hautoberfläche und anschließendem Auszupfen von Haaren war es möglich, die unter der Haut liegende Haarfollikellänge zu bestimmen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass diese beim Schwein durchschnittlich ca. 3,5 mm beträgt. Das Haarwachstum in dieser Region liegt bei ca. $6,6 \pm 0,5$ mm (LS-Means \pm Standard error) pro Monat (Abb. 2). Über den Haarfollikel eingelagertes, endogenes Cortisol erscheint daher mit einer Verzögerung von ca. 2 Wochen im Haarschaft über der Hautoberfläche und ist dann im rasierten Haar messbar. Im Vergleich zu Nacken- und Rückenregion ist das Haarwachstum an der Schwanzspitze signifikant erhöht (Abb. 2). Die Haare der Schwanzspitze weisen darüber hinaus die höchsten Cortisolkonzentrationen auf, während die Unterschiede zwischen Nackenbereich und hinterem Rücken geringer ausfallen (Abb. 2). Es wird vermutet, dass dafür das höhere Haarwachstum an der Schwanzspitze oder eine erhöhte Durchblutung verantwortlich sein können (Burnett et al., 2014; Carlitz et al., 2015).

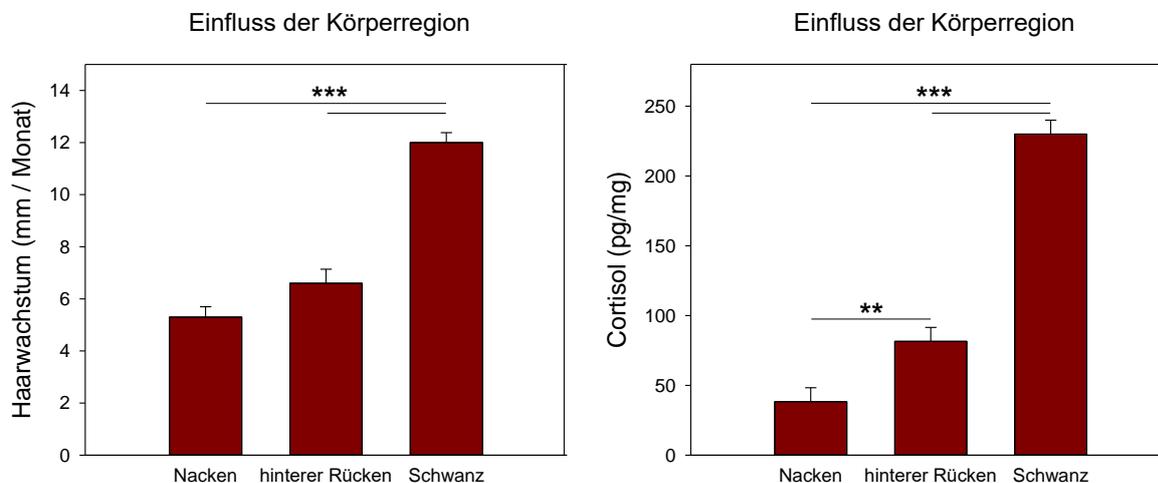


Abb. 2: Einfluss der Körperregion auf das Haarwachstum und den Haarcortisolgehalt beim Schwein (ANOVA, Proc Mixed, paarweiser Vergleich nach Tukey-Kramer, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$)

Untersuchungen zum Einfluss des Lebensalters zeigen, dass Ferkel in der 2. Lebenswoche signifikant erhöhte Haarcortisolkonzentrationen aufweisen, die in den nachfolgenden Lebenswochen deutlich abfallen und mit zunehmendem Alter wieder ansteigen (Abb. 3). Hohe Werte bei sehr jungen Tieren wurden auch bei Kälbern und Fohlen gefunden (González-de-la-Vara et al., 2011; Comin et al., 2012; Montillo et al., 2014) und könnten durch höhere endogene

Cortisolkonzentrationen während der späten Trächtigkeit und kurz vor der Geburt verursacht werden (Obel et al., 2005). Ein späterer Wiederanstieg könnte durch ein vermindertes negatives Feedback der HPA-Achse mit zunehmendem Alter erklärt werden (Kudielka et al., 2009).

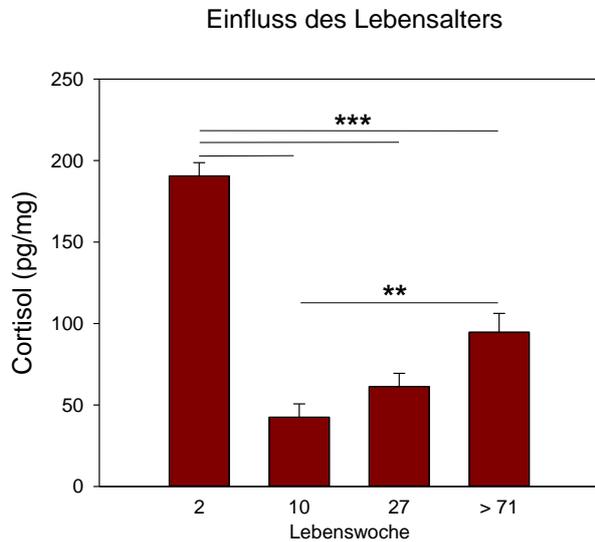


Abb. 3: Einfluss des Lebensalters auf den Haarcortisolgehalt beim Schwein (ANOVA, Proc Mixed, paarweiser Vergleich nach Tukey-Kramer, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$)

Dagegen hatte das Geschlecht der Tiere keinen Einfluss auf die Haarcortisolkonzentrationen. Ebenso zeigen sich keine saisonalen Unterschiede zwischen Proben, die im Sommer und im Winter entnommen wurden (Abb. 4).

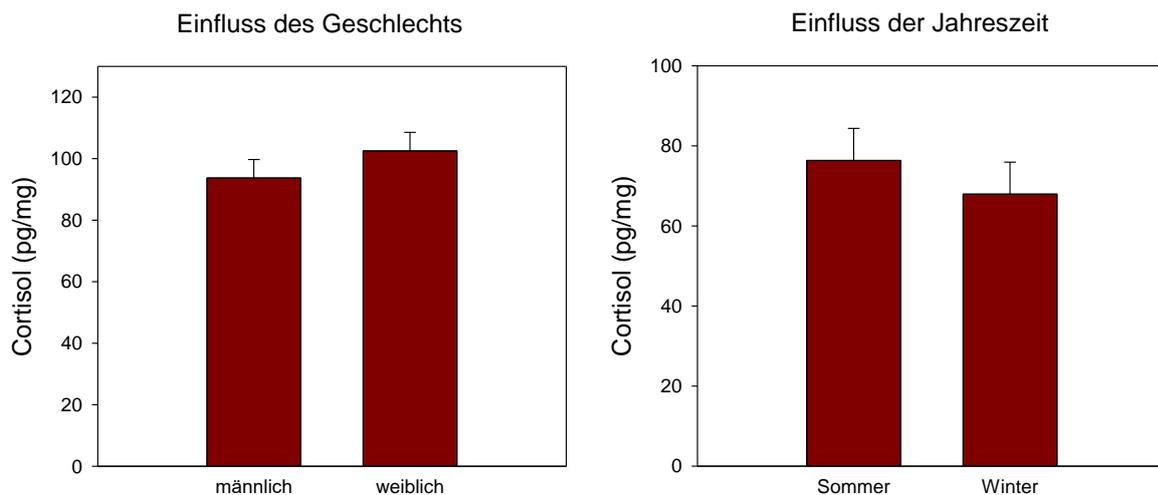


Abb. 4: Einfluss des Geschlechts und der Jahreszeit auf den Haarcortisolgehalt beim Schwein (ANOVA, Proc Mixed, paarweiser Vergleich nach Tukey-Kramer)

Der Einfluss verschieden alter Haarsegmente wurde bei Sauen am 70. Trächtigkeitstag untersucht. Im Bereich des hinteren Rückens wurden durch die Verwendung verschiedener Rasierervorsätze Haarsegmente von distal beginnend nach proximal gewonnen. Es wurden folgende vier Haarsegmente geerntet (distal -> proximal): >3 cm, 2-3 cm, 1-2 cm, 0-1 cm. Die Ergebnisse zeigen, dass das Alter des Haarsegments ein wesentlicher Variationsfaktor für den Haarcortisolgehalt ist. Es konnte eine deutliche Zunahme der Cortisolkonzentrationen in den älteren (distalen) Haarsegmenten im Vergleich zu jüngeren Haarsegmenten gefunden werden (Abb. 5). Beim Menschen sowie bei Affen, Bären, Pferden und Hunden wurde dagegen über eine Abnahme oder gleichbleibende Cortisolkonzentration entlang des Haarschafts berichtet. Dafür wird als mögliche Ursache zum Beispiel UV-Strahlung (Sonnenlicht) und häufiges Haarewaschen diskutiert (Heimbürge et al., 2019). Die bisher nicht beschriebene Zunahme der Cortisolgehalte entlang des Haarschafts könnte beim Schwein durch verstärkte Kontamination mit cortisolhaltigen Körperflüssigkeiten (Urin, Speichel) während der Haltung verursacht werden. Zwar werden äußere Kontaminationen durch das Waschen der Haarproben vor der Analytik entfernt, ein stabiler Einbau von Cortisol in den Haarschaft durch häufigen und langanhaltenden Kontakt mit Urin und Speichel ist aber nicht auszuschließen und müsste im Fokus weitergehender Untersuchungen stehen. Eine detaillierte Darstellung und Diskussion der oben aufgeführten Ergebnisse erfolgt in der Publikation von Heimbürge et al. (2020a).

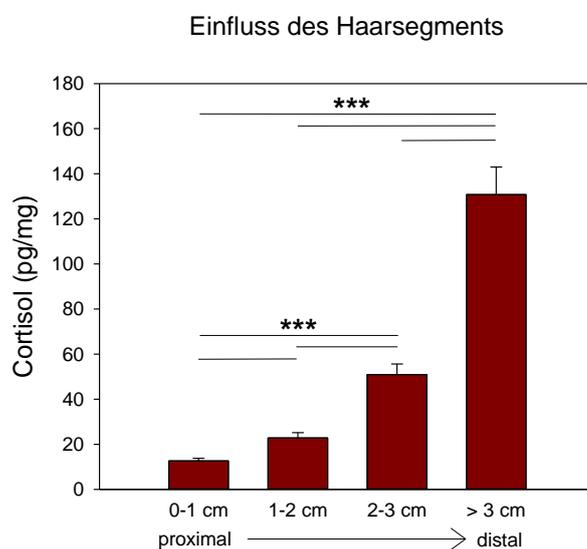


Abb. 5: Einfluss des Alters des Haarsegments auf den Haarcortisolgehalt beim Schwein (ANOVA, Proc Mixed, paarweiser Vergleich nach Tukey-Kramer, *** $p < 0.001$)

Zur Untersuchung des Einflusses von Trächtigkeit und Laktation wurden bei Sauen zu vier Zeitpunkten im Abstand von 31-38 Tagen über einen Reproduktionszyklus hinweg wiederholt Haarproben entnommen. Dabei wurden im hinteren Rückenbereich sowohl native Haare als auch der

Haaraufwuchs seit der letzten Entnahme beprobt (shave-reshave Methode nach Davenport et al., 2008; Meyer and Novak, 2012). Höhere Cortisolkonzentrationen in nativen Haaren nach der Geburt und während der Laktation nehmen bis zum 77. Trächtigkeitstag ab, wobei die Werte eine starke Streuung aufweisen und sich nicht signifikant voneinander unterscheiden (Abb. 6). Aufwuchshaare zeigen signifikant erhöhte Konzentrationen 32 Tage post partum, was unter Berücksichtigung der Zeitverzögerung die erhöhten endogenen Cortisolkonzentrationen in der späten Trächtigkeit und um den Zeitraum der Geburt widerspiegelt (Abb. 6). Auffällig sind die höheren Cortisolkonzentrationen und die höhere Streuung in nativen im Vergleich zu Aufwuchshaaren. Hier zeigt sich der bereits bei den Haarsegmenten gefundene Einfluss des Alters des Haares. Zur besseren und genaueren Abbildung von einzelnen Zeitabschnitten mit unterschiedlicher Cortisoleinlagerung erscheint daher die shave-reshave Methode besser geeignet.

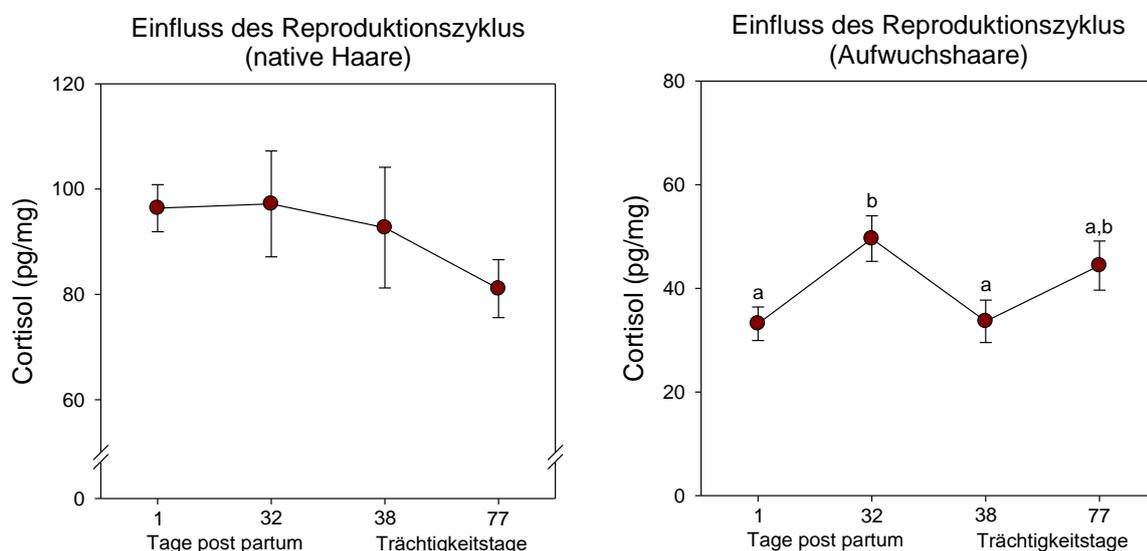


Abb. 6: Einfluss von Trächtigkeit und Laktation auf den Haarcortisolgehalt beim Schwein (ANOVA, Proc Mixed, paarweiser Vergleich nach Tukey-Kramer, a vs. b $p < 0.05$)

3.3 Validierung als retrospektiver Indikator für Stressbelastungen

Zur Validierung von Haarcortisolkonzentrationen als möglichen Belastungsindikator wurden zum einen Probenentnahmen nach ACTH-induzierter Stimulation der Cortisolfreisetzung (experimentelle Stressbelastung) sowie in praxisrelevanten Haltungssituationen nach mehrwöchiger Haltung unter verschiedenen Belastungsbedingungen durchgeführt. Als praxisrelevante Faktoren wurde der Einfluss eines unterschiedlichen Flächenangebots bzw. Tier-Fressplatz-Verhältnisses sowie der Einfluss der Kastration bei männlichen Tieren untersucht. Die experimentelle Stressbelastung durch wiederholte ACTH-Applikationen wurde an Jungsauen (Deutsche Landrasse) in der Experimentalanlage des FBN

untersucht, während die Haarproben für die praxisrelevanten Belastungsfaktoren in den Schweinebeständen von zwei Praxispartnerbetrieben genommen wurden (Kreuzungstiere).

3.3.1 Ergebnisse

Der Einfluss von ACTH-induzierter Stimulation der Cortisolfreisetzung wurde an 38 Jungsaunen in der Experimentalanlage des FBN untersucht. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn 20-23 Wochen alt. Die Haltung erfolgte in sechs Gruppen à 7 Tieren, jeweils mit ACTH-, Kontroll- und Reservetieren. Über einen Zeitraum von 4 Wochen erhielten die Versuchstiere alle zwei Tage entweder eine i.m. Applikation von 100 IU ACTH (Synacthen Depot, sigma-tau, München) in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung oder nur 2 ml Kochsalzlösung. Während der vier Versuchswochen wurden zur Verifizierung der Cortisolantwort an einem Tag pro Woche Speichelproben vor, 1, 2, 3, 6 und 9 h nach ACTH/NaCl-Gabe entnommen. Native Haarproben wurden vor Versuchsbeginn sowie nach 4 Wochen (Ende der Applikationsperiode), 8 und 12 Wochen gewonnen. Zusätzlich wurde nach 4, 8 und 12 Wochen der Aufwuchs seit der letzten Entnahme beprobt. Darüber hinaus wurden nach 12 Wochen Haarsegmente bei nativen Haaren gewonnen (distal -> proximal: 2-3 cm, 1-2 cm, 0-1 cm).

Die Ergebnisse zeigen, dass wiederholte i.m. Applikationen von 100 I.E. ACTH auch wiederholte endogene Cortisolfreisetzungen induzieren. Dies zeigt sich in erhöhten Speichelcortisolkonzentrationen über einen Zeitraum von mehreren Stunden nach Applikation (Abb. 7).

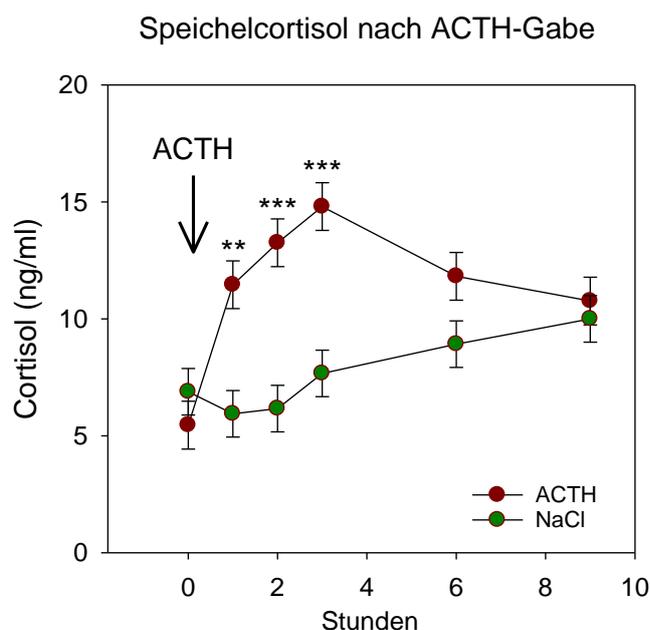


Abb. 7: Einfluss einer i.m. Applikation von ACTH/NaCl auf den Speichelcortisolgehalt beim Schwein (ANOVA, Proc Mixed, paarweiser Vergleich nach Tukey-Kramer, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$)

Diese wiederholt erhöhten Cortisolfreisetzungen spiegeln sich auch in erhöhten Haarcortisolkonzentrationen in nativen Haaren sowie in nachgewachsenen Haaren nach 4 Wochen wider (Abb. 8). Dies zeigt, dass Haarcortisolkonzentrationen beim Schwein vorangegangene Zeiträume mit erhöhter Cortisolfreisetzung abbilden können.

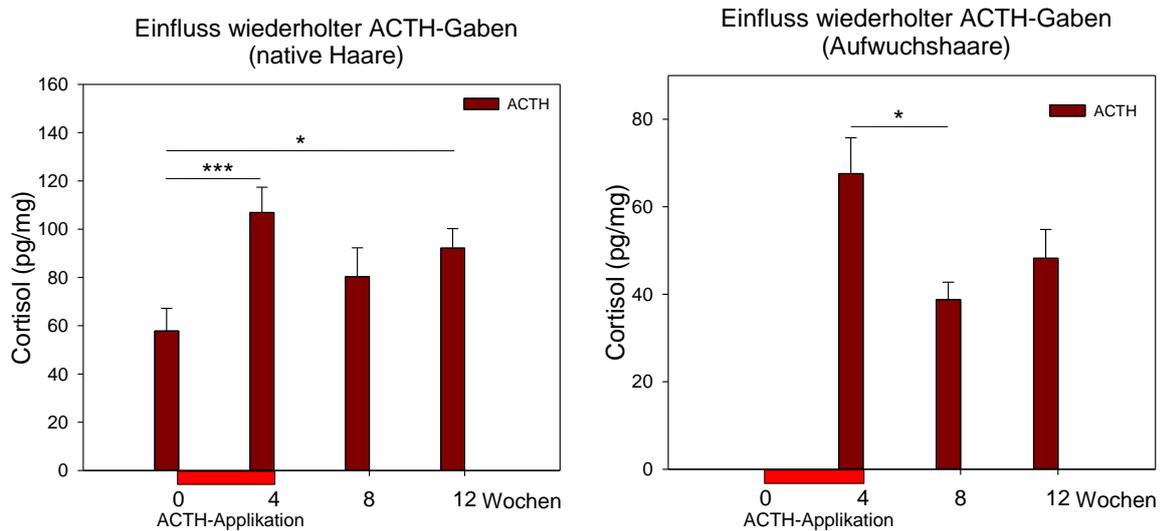


Abb. 8: Einfluss wiederholter i.m. Applikationen von ACTH auf den Haarcortisolgehalt beim Schwein (ANOVA, Proc Mixed, paarweiser Vergleich nach Tukey-Kramer, *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$)

Bei Betrachtung der Ergebnisse für die Kontrolltiere zeigt sich jedoch ebenfalls ein Anstieg der Haarcortisolkonzentrationen in nativen Haaren nach 4 Wochen, aber kein Unterschied zu den ACTH-Tieren (Abb. 9). Wiederholter Stress bedingt durch die Applikation kann als Ursache ausgeschlossen werden, wie die unveränderten Speichelcortisolwerte der Kontrolltiere nach Injektion zeigen. Es ist eher zu vermuten, dass bei der Gruppenhaltung der Tiere (gemischte Gruppen von ACTH- und Kontrolltieren) eine gegenseitige Kontamination über Urin bzw. Speichel erfolgt. Beide Matrices enthalten Cortisol und erhöhte Cortisolkonzentrationen im Speichel bzw. Urin von ACTH-Tieren könnte zu einer erhöhten Kontamination und Einlagerung in die Haare von anderen Tieren der Gruppe führen. Die Haarsegmente in Haarproben nach 12 Wochen zeigen ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Behandlungen, jedoch die bereits beschriebene Zunahme der Cortisolkonzentrationen von proximalen zu distalen Segmenten (Abb. 10). Eine detaillierte Darstellung und Diskussion der oben aufgeführten Ergebnisse erfolgt in der Publikation von Heimbürge et al. (2020b).

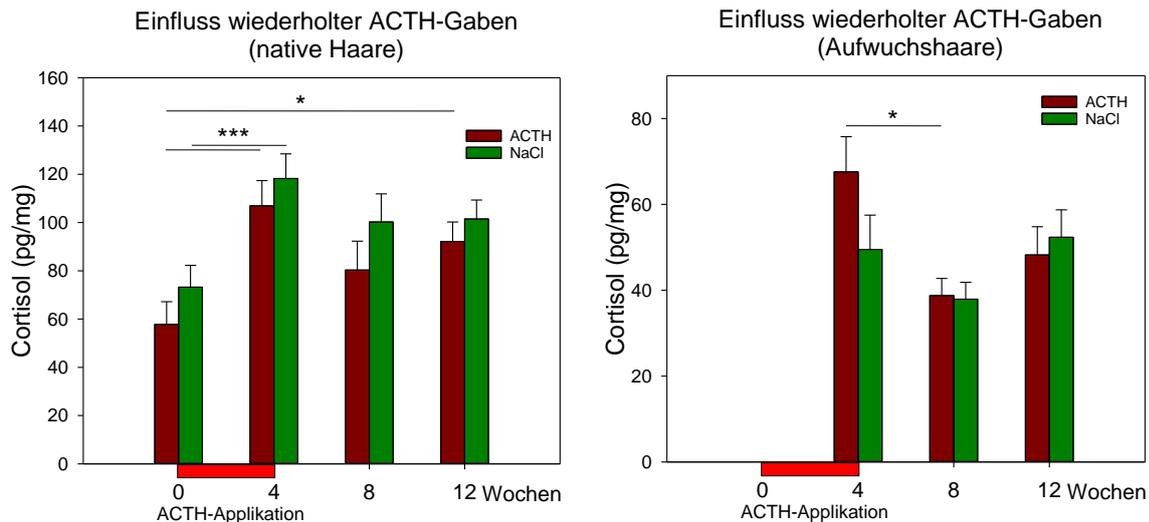


Abb. 9: Einfluss wiederholter i.m. Applikationen von ACTH bzw. NaCl auf den Haarcortisolgehalt beim Schwein (ANOVA, Proc Mixed, paarweiser Vergleich nach Tukey-Kramer, *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$)

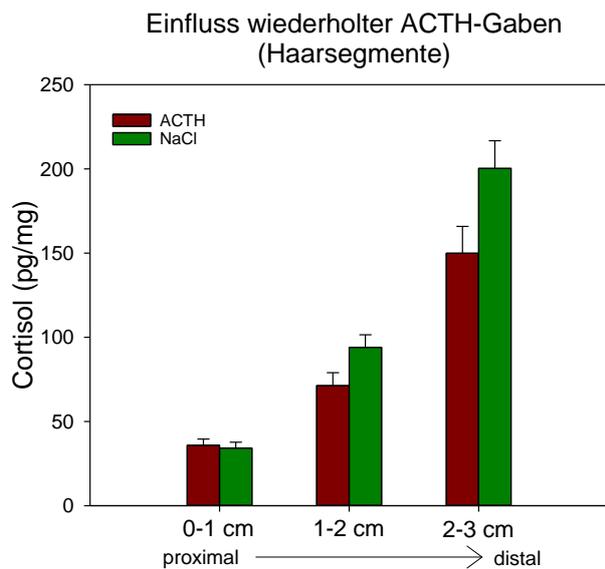


Abb. 10: Einfluss wiederholter i.m. Applikationen von ACTH bzw. NaCl auf den Haarcortisolgehalt in Haarsegmenten beim Schwein (ANOVA, Proc Mixed, paarweiser Vergleich nach Tukey-Kramer, $p < 0.001$ für den Vergleich der verschiedenen Segmente)

Der Einfluss des Tierfressplatz-Verhältnisses (TFV) wurde bei männlichen und weiblichen Mastläufern im Flatdeck von der 5.-11. Lebenswoche und bei männlichen und weiblichen Mastschweinen von der 12.-23. Lebenswoche untersucht. Mastläufer wurden in jeweils zwei Gruppen à 19 Tieren bei einem TFV von 4:1 (hoch, Standard) bzw. von 2:1 (niedrig, verbesserte Haltung) gehalten. Mastschweine wurden in jeweils zwei Gruppen à 22 Tieren ebenfalls bei einem TFV von 4:1 (hoch, Standard) bzw. von 2:1 (niedrig, verbesserte Haltung) gehalten. Die Entnahme nativer Haarproben erfolgte jeweils zum Ende der Haltungsperiode (Mastläufer: 11. Lebenswoche,

Mastschweine: 23. Lebenswoche). Im Vergleich der beiden Haltungformen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Ein schlechteres TFV führte jedoch bei Mastschweinen zu tendenziell höheren Haarcortisolkonzentrationen (Abb. 11). Die Haarproben aus den Untersuchungen zu unterschiedlichen Besatzdichten bei der Haltung von Läufern und Mastschweinen waren zum Zeitpunkt des Abschlussberichts noch nicht vollständig analysiert, so dass noch keine abschließenden Ergebnisse dafür vorliegen.

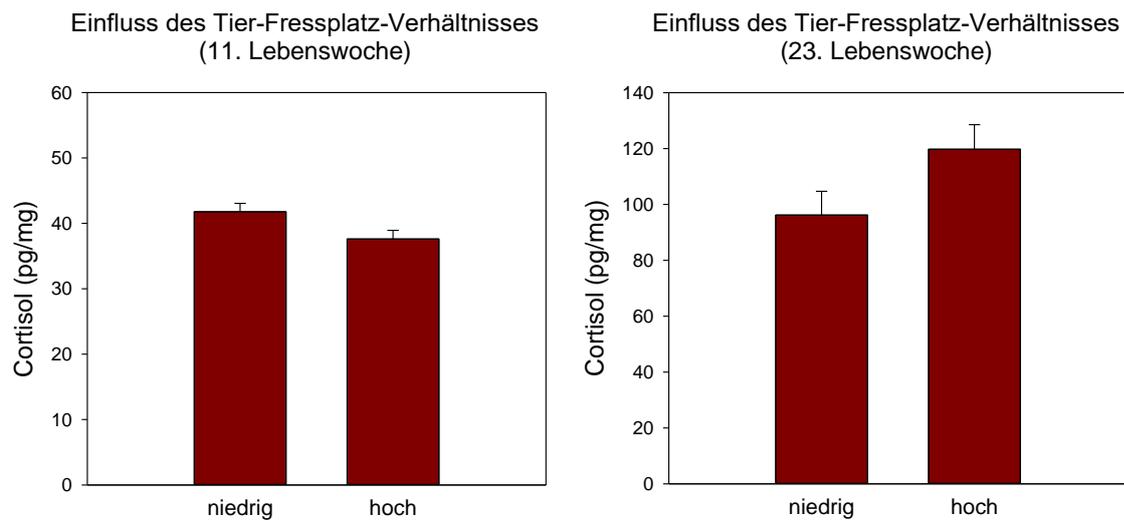


Abb. 11: Einfluss des Tier-Fressplatz-Verhältnisses auf den Haarcortisolgehalt beim Schwein (ANOVA, Proc Mixed, paarweiser Vergleich nach Tukey-Kramer)

Der Einfluss der Kastration bei männlichen Tieren wurde an 36 unkastrierten Ebern und 36 Kastraten in der 13. und 23. Lebenswoche untersucht. Die Tiere wurden während dieser Zeit in je 4 Gruppen à 9 Eber bzw. Kastraten unter gleichen Haltungsbedingungen gehalten. In der 13. Lebenswoche wiesen unkastrierte Eber signifikant höhere Haarcortisolkonzentrationen auf während es in der 23. Lebenswoche keine Unterschiede zwischen kastrierten und unkastrierten Tieren gab (Abb. 12). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Einfluss der Kastration auf die Cortisolfreisetzung vom Alter der Tiere und von der Steroidbiosynthese zum jeweiligen Zeitpunkt oder von Unterschieden in der Haltungsumwelt der vorhergehenden Haltungsperiode (Flatdeck vs. Maststall) abhängig ist.

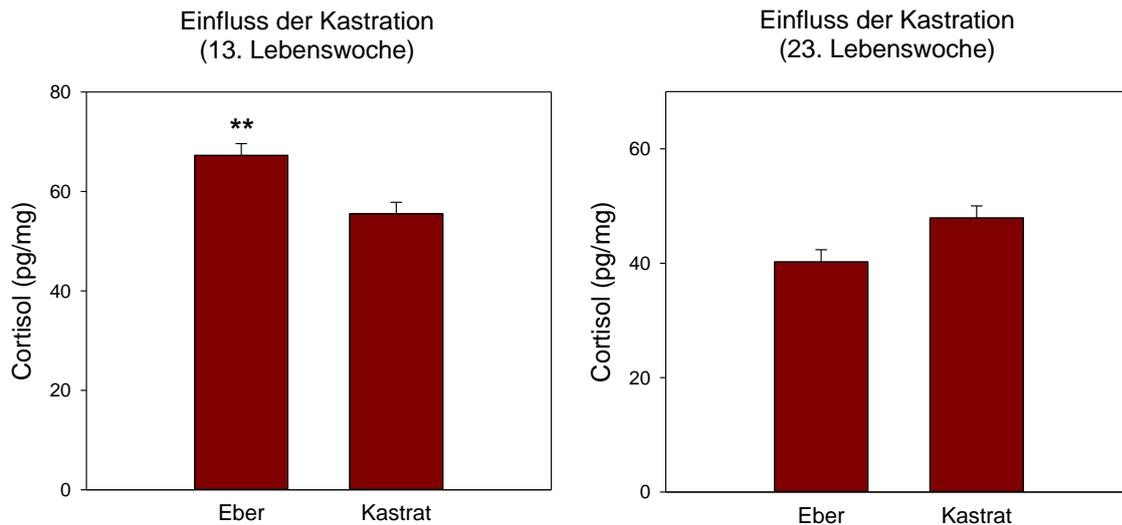


Abb. 12: Einfluss der Kastration männlicher Tiere auf den Haarcortisolgehalt beim Schwein (ANOVA, Proc Mixed, paarweiser Vergleich nach Tukey-Kramer, ** $p < 0.01$)

4. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen des Projekts wurde ein Methodenprotokoll zum Cortisolnachweis in Haaren von Schweinen erarbeitet, welches für die Cortisolbestimmungen bei den nachfolgenden Fragestellungen zum Einsatz kam.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass beim Schwein die Haarprobenentnahme im Bereich des hinteren Rückens (Lendenwirbelsäule) am praktikabelsten ist. Diese Region wurde daher als Standardentnahmeregion für die Haarentnahme in den weiteren Versuchen ausgewählt. Unter Berücksichtigung der Haarfollikellänge und des Haarwachstums in dieser Region erscheint über den Haarfollikel eingelagertes endogenes Cortisol mit einer Verzögerung von ca. 2 Wochen im Haarschaft über der Hautoberfläche und ist dann im rasierten Haar messbar.

Die Ergebnisse zum Haarcortisol zeigen, dass beim Schwein die Konzentrationen von der Körperregion der Haarentnahme, vom Alter der Tiere und vom Reproduktionszyklus bei weiblichen Tieren beeinflusst werden. Daher sollten bei Untersuchungen zu haltungsbedingten Stressfaktoren Haarproben von Tieren mit vergleichbarer Altersgruppe und Reproduktionsstadium verwendet und Haarproben einer Körperregion betrachtet werden.

Die in unseren Ergebnissen gefundene Zunahme der Haarcortisolkonzentration von proximalen zu distalen Haarsegmenten deutet auf mögliche Kontaminationseinflüsse mit zunehmendem Alter des Haares hin. Eine verstärkte Kontamination könnte durch häufigen Kontakt mit cortisolhaltigen Körperflüssigkeiten (Urin, Speichel), insbesondere unter intensiven Haltungsbedingungen verursacht werden. Zwar werden äußere Kontaminationen durch das Waschen der Haarprobe vor der Analytik

entfernt, ein stabiler Einbau von Cortisol in den Haarschaft ist aber nicht auszuschließen und sollte im Fokus weitergehender Untersuchungen stehen.

Unsere Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass beim Schwein zeitliche Perioden mit erhöhter HPA-Achsenaktivität und erhöhter endogener Cortisolfreisetzung (z.B. ACTH-Stimulation als Simulation eines wiederholten Stressors) auch durch erhöhte Haarcortisolkonzentrationen abgebildet werden. Die Haarcortisolkonzentration kann daher ein retrospektiver Indikator für Phasen mit erhöhter Freisetzung des Stresshormons Cortisol sein. Weitergehende Untersuchungen können zeigen, ob zur Minimierung möglicher Kontaminationseinflüsse und zur genaueren Abbildung von haltungs- und stressbedingten Einflüssen eine vorherige Nullrasur und die Verwendung von Aufwuchshaaren über eine definierte Zeitperiode besser geeignet ist.

5. Fachbeiträge, Fachpublikationen

- Posterbeitrag auf dem 69th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, Dubrovnik (August 2018): Heimbürge, S.; Kanitz, E.; Otten, W.: Influencing factors on hair cortisol concentrations in pigs and cattle. Book of Abstracts, 447.
- Posterbeitrag auf dem UFAW International Symposium “Advancing animal welfare science: How do we get there? – Who is it good for?”, Brügge (Juli 2019): Heimbürge, S.; Kanitz, E.; Tuchscherer, A.; Otten, W.: Evaluation of hair cortisol concentrations as a retrospective indicator for long-term stress in pigs and cattle.
- Literaturreview in *General and Comparative Endocrinology* über die Eignung von Haarcortisol als Stressindikator bei Tieren:
Heimbürge, S.; Kanitz, E.; Otten, W. (2019): The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals. *Gen. Comp. Endocrinol.* 270: 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.09.016>
- Ergebnispaper über Einflussfaktoren auf Haarcortisol und die verwendete Methodik:
Heimbürge, S.; Kanitz, E.; Tuchscherer, A.; Otten, W. (2020a): Within a hair’s breadth – Factors influencing hair cortisol levels in pigs and cattle. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 288: 113359. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113359>
- Ergebnispaper über den Einfluss einer experimentellen Stressbelastung auf Haarcortisol:
Heimbürge, S.; Kanitz, E.; Tuchscherer, A.; Otten, W. (2020b): Is it getting in the hair? – Cortisol concentrations in native, regrown and segmented hairs of cattle and pigs after repeated ACTH administrations. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 295: 113534. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113534>

6. Literaturliste

- Bacci, M.L.; Nannoni, E.; Govoni, N.; Scorrano, F.; Zannoni, A.; Forni, M.; Martelli, G.; Sardi, L. (2014). Hair cortisol determination in sows in two consecutive reproductive cycles. *Reprod. Biology* 14: 218-223.
- Burnett, T.A.; Madureira, A.M.L.; Silper, B.F.; Nadalin, A.; Tahmasbi, A.; Veira, D.M.; Cerri, R.L.A. (2014). Factors affecting hair cortisol concentrations in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97: 7685-7690.
- Burnett, T.A.; Madureira, A.M.L.; Silper, B.F.; Tahmasbi, A.; Nadalin, A.; Veira, D.M.; Cerri, R.L.A. (2015). Relationship of concentrations of cortisol in hair with health, biomarkers in blood, and reproductive status in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98: 4414-4426.
- Carlitz, E.H.D.; Kirschbaum, C.; Miller, R.; Rukundo, J.; van Schaik, C.P. (2015). Effects of body region and time on hair cortisol concentrations in chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 223: 9-15.
- Chrousos, G.P.; Kino, T. (2007). Glucocorticoid action networks and complex psychiatric and/or somatic disorders. *Stress* 10: 213-219.
- Comin, A.; Veronesi, M.C.; Montillo, M.; Faustini, M.; Valentini, S.; Cairoli, F.; Prandi, A. (2012). Hair cortisol level as a retrospective marker of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in horse foals. *Vet. J.* 194: 131-132.
- Davenport, M.D.; Lutz, C.K.; Tiefenbacher, S.; Novak, M.A.; Meyer, J.S. (2008). A rhesus monkey model of self-injury: effects of relocation stress on behavior and neuroendocrine function. *Biol. Psychiatry* 63: 990-996.
- Dettenborn, L.; Tietze, A.; Bruckner, F.; Kirschbaum, C. (2010). Higher cortisol content in hair among long-term unemployed individuals compared to controls. *Psychoneuroendocrinology* 35: 1404-1409.
- Dettenborn, L.; Muhtz, C.; Skoluda, N.; Stalder, T.; Steudte, S.; Hinkelmann, K.; Kirschbaum, C.; Otte, C. (2012). Introducing a novel method to assess cumulative steroid concentrations: increased hair cortisol concentrations over 6 months in medicated patients with depression. *Stress* 15: 348-353.
- Dettmer, A.M.; Novak, M.A.; Suomi, S.J.; Meyer, J.S. (2012). Physiological and behavioral adaptation to relocation stress in differentially reared rhesus monkeys: hair cortisol as a biomarker for anxiety-related responses. *Psychoneuroendocrinology* 37: 191-199.
- Dowlati, Y.; Herrmann, N.; Swardfager, W.; Thomson, S.; Oh, P.I.; Van Uum, S.; Koren, G.; Lanctot, K.L. (2010). Relationship between hair cortisol concentrations and depressive symptoms in patients with coronary artery disease. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 6: 393-400.
- Fairbanks, L.A.; Jorgensen, M.J.; Bailey, J.N.; Breidenthal, S.E.; Grzywa, R.; Laudenslager, M.L. (2011). Heritability and genetic correlation of hair cortisol in vervet monkeys in low and higher stress environments. *Psychoneuroendocrinology* 36: 1201-1208.
- Ghassemi Nejad, J.; Lohakare, J.D.; Son, J.K.; Kwon, E.G.; West, J.W.; Sung, K.I. (2014). Wool cortisol is a better indicator of stress than blood cortisol in ewes exposed to heat stress and water restriction. *Animal* 8: 128-132.
- González-de-la-Vara, M.; Valdez, R.A.; Lemus-Ramirez, V.; Vázquez-Chagoyán, J.C.; Villa-Godoy, A.; Romano, M.C. (2011). Effects of adrenocorticotrophic hormone challenge and age on hair cortisol concentrations in dairy cattle. *Can. J. Vet. Res.* 75: 216-221.
- Kalra, S.; Einarson, A.; Karaskov, T.; Van Uum, S.; Koren, G. (2007). The relationship between stress and hair cortisol in healthy pregnant women. *Clin. Invest. Med.* 30: E103-107.
- Kudielka, B.M.; Hellhammer, D.H.; Wüst, S. 2009. Why do we respond so differently? Reviewing determinants of human salivary cortisol responses to challenge. *Psychoneuroendocrinology* 34: 2-18.
- Meyer, J.; Novak, M.; Hamel, A.; Rosenberg, K. (2014). Extraction and analysis of cortisol from human and monkey hair. *J. Vis. Exp.* (83), e50882.

- Montillo, M.; Comin, A.; Corazzin, M.; Peric, T.; Faustini, M.; Veronesi, M.C.; Valentini, S.; Bustaffa, M.; Prandi, A. (2014). The Effect of temperature, rainfall, and light conditions on hair cortisol concentrations in newborn foals. *J. Equine Vet. Sci.* 34: 774–778.
- Moya, D.; Schwartzkopf-Genswein, K.S.; Veira, D.M. (2013). Standardization of a non-invasive methodology to measure cortisol in hair of beef cattle. *Livest. Sci.* 158: 138-144.
- Novak, M.A.; Hamel, A.F.; Kelly, B.J.; Dettmer, A.M.; Meyer, J.S. (2013). Stress, the HPA axis, and nonhuman primate well-being: A review. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 143: 135-149.
- Obel, C.; Hedegaard, M.; Henriksen, T.B.; Secher, N.J.; Olsen, J.; Levine, S. (2005). Stress and salivary cortisol during pregnancy. *Psychoneuroendocrinology* 30: 647–656.
- Russell, E.; Koren, G.; Rieder, M.; Van Uumb, S. (2012). Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology* 37: 589–601.
- Stalder, T.; Kirschbaum, C. (2012). Analysis of cortisol in hair – State of the art and future directions. *Brain Behav. Immun.* 26: 1019–1029.
- Steudte, S.; Kolassa, I.-T.; Stalder, T.; Pfeiffer, A.; Kirschbaum, C.; Elbert, T. (2011). Increased cortisol concentrations in hair of severely traumatized Ugandan individuals with PTSD. *Psychoneuroendocrinology* 36: 1193–1200.
- Tallo-Parra, O.; Manteca, X.; Sabes-Alsina, M.; Carbajal, A.; Lopez-Bejar, M. (2015). Hair cortisol detection in dairy cattle by using EIA: protocol validation and correlation with faecal cortisol metabolites. *Animal* 9: 1059–1064.
- Van Uum, S.H.; Sauve, B.; Fraser, L.A.; Morley-Forster, P.; Paul, T.L.; Koren, G. (2008). Elevated content of cortisol in hair of patients with severe chronic pain: a novel biomarker for stress. *Stress* 11: 483–488.
- Yamada, J.; Stevens, B.; de Silva, N.; Gibbins, S.; Beyene, J.; Taddio, A.; Newman, C.; Koren, G. (2007). Hair cortisol as a potential biologic marker of chronic stress in hospitalized neonates. *Neonatology* 92: 42–49.