

**Neuroendokrine Modulation des Immunsystems durch wiederholte  
Antizipation beim Hausschwein (*Sus scrofa domestica*)**

Dissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Rostock

Aus dem Institut für Verhaltensphysiologie des Leibniz-Instituts für Nutztierbiologie (FBN),  
Dummerstorf

Vorgelegt von

Jana Brietzke, geb. am 20.08.1983 in Rostock

aus Rostock

Rostock, 22.03.2016

## Gutachter

Prof. Dr. rer. nat. habil. Ulrike Gimsa

Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) Dummerstorf,

Institut für Verhaltensphysiologie, Abteilung Neuroimmunologie

PD. Dr. rer. nat. Michael Linnebacher

Abteilung für Allgemeine-, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie

Chirurgische Universitätsklinik Rostock

Molekulare Onkologie und Immuntherapie (M.O.I)

Tag der Verteidigung: 04.07.2016

Meiner Familie gewidmet.

*Man muss aus der Stille kommen, um etwas Gedeihliches zu schaffen.*

*Kurt Tucholsky*

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	iii
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	v
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	x
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	xii
<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Einführung .....	1
1.2 Tierwohl und Wohlbefinden .....	2
1.3 Stresskonzepte .....	3
1.4 Das Immunsystem .....	5
1.5 Antizipation und Stimmungen .....	9
1.6 Beeinflussung des Immunsystems durch Stress und Stimmungen .....	11
1.7 Zielstellung der Arbeit .....	16
<b>2. Material und Methoden</b> .....	18
2.1 Tiere und Haltungsbedingungen .....	18
2.2 Experimentelles Design .....	20
2.3 Entnahme von Blut, Gewebe und Speichel .....	22
2.4 Chemikalien .....	23
2.5 Zellisolation und- kultur .....	24
2.5.1 Vollbluttest .....	24
2.5.2 Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs) .....	25
2.5.3 Myeloische Blutzelllinie K562 .....	26
2.6 Allgemeiner Gesundheitszustand .....	26
2.6.1 Körpergewicht .....	26
2.6.2 Eiweißgehalt .....	26
2.6.3 Leukozytenzahl .....	26
2.6.4 Tiergesundheit .....	27
2.7 Analytik .....	28
2.7.1 Physiologische Parameter der HPA-Achse .....	28
2.7.2 Neurotransmitter .....	31
2.7.3 Physiologische Parameter des Immunsystems .....	32
2.8 Statistik .....	39

<b>3. Ergebnisse</b> .....	41
3.1 Allgemeiner Gesundheitszustand.....	41
3.1.1 Körpergewicht .....	41
3.1.2 Eiweißgehalt.....	41
3.1.3 Leukozytenzahl.....	44
3.1.4 Tiergesundheit.....	45
3.2. Physiologische Parameter der HPA-Achse .....	46
3.2.1 Einfluss der einzelnen Faktoren und ihrer Interaktionen auf die Parameter der HPA-Achse.....	46
3.2.2 ACTH .....	47
3.2.3 Cortisol.....	48
3.2.4 Genexpression von CRH und GR.....	49
3.2.5 Nebennieren.....	50
3.3 Neurotransmitter.....	51
3.4 Physiologische Parameter des Immunsystems .....	55
3.4.1 Einfluss des Faktors Durchgang auf die Immunparameter .....	55
3.4.2 Lymphozytenproliferation.....	56
3.4.3 Immunglobuline A, G und M.....	57
3.4.4 Zytokine .....	59
3.4.5 NK-Zell-Assay.....	62
3.4.6 Differentialblutbild .....	64
<b>4. Diskussion</b> .....	67
4.1 Allgemein.....	67
4.2 Versuchsdesign .....	67
4.3 Effekte auf die Parameter der HPA-Achse .....	69
4.4 Effekte auf die Neurotransmitter und deren Metaboliten.....	74
4.5 Effekte auf die Parameter des Immunsystems .....	77
4.6 Fazit.....	85
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	87
<b>6. Summary</b> .....	90
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	I
<b>Lebenslauf</b> .....	XVII
<b>Veröffentlichungen und Vorträge</b> .....	XVIII
<b>Danksagung</b> .....	XX
<b>Selbständigkeitserklärung</b> .....	XXI

## Abkürzungsverzeichnis

---

°C	Grad Celsius
× g	Erdbeschleunigung
%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Δ	Differenz
5-HIAA	5-Hydroxyindol-3-Essigsäure
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
A	Adrenalin
AAS	Allgemeine Adaptationssyndrom
Abb.	Abbildung
AcH	Acetylcholin
ACTB	beta-Actin
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AF	Angekündigte Fütterung
akust.	akustisch
AL	Angekündigter Luftstoß
AK	Angekündigter Konflikt
ANOVA	(engl.) <i>analysis of variance</i> = (dt.) Varianzanalyse
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
Aqua dest.	(lat.) <i>aqua destillata</i> = (dt.) destilliertes Wasser
AVP	Arginin-Vasopressin
B	Blut
BCGF	(engl.) <i>B cell growth factor</i> = (dt.) B-Zell-Wachstumsfaktor
BCR	(engl.) <i>B cell receptor</i> = (dt.) B-Zellrezeptor
Beh.	Behandlung
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa
CA	(engl.) catecholamine = (dt.) Katecholamine
CD	(engl.) <i>cluster of differentiation</i>
cDNA	(engl.) <i>complementary DNA</i> = (dt.) komplementäre DNA

ConA	Concanavalin A
Ct-Wert	(engl.) <i>cycle threshold</i>
CRH	(engl.) <i>Corticotropin-releasing hormone</i> = (dt.) Corticotropin-freisetzendes Hormone
CTL	(engl.) <i>cytotoxic T cell</i> = (dt.) zytotoxische T-Zelle
d	Tag
DA	Dopamin
dB	Dezibel (Einheit für Schalldruckpegel)
DC	Dendritische Zellen
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DG	Versuchsdurchgang
d. h.	das heißt
DHAB	Dihydroxybenzylamin
DIOC18	3,3'-Dioctadecyloxacarbocyaninperchlorat
DNA	(engl.) deoxyribonucleic acid = (dt.) Desoxyribonukleinsäure
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure
dt.	deutsch
e	Ende (Versuchsabschnitt Speichelproben)
E	Effektorzellen (NK-Zell-Assay)
EAS	Experimentalanlage Schwein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure oder Ethylendiamin-Tetraacetat
ELISA	(engl.) <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> = (dt.) enzymgebundener Immunabsorptionstest
engl.	englisch
et al.	(lat.) et alii = (dt.) und andere
F	F-Wert aus der Varianzanalyse
FAWC	(engl.) <i>UK Farm Animal Welfare Council</i>
FBN	Leibniz-Institut für Nutztierbiologie
FF	Feste Fütterung
FKS	Fötales Kälberserum
FS	(engl.) forward scatter = (dt.) Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GC	Glucocorticoid
GR	Glucocorticoidrezeptor

h	Stunde
<i>h</i>	Handling (Versuchsabschnitt Speichelproben)
HBS	(engl.) <i>HEPES Buffered Saline</i> = (dt.) HBS-Puffer
HEPES	(2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)
HPA	(engl.) hypothalamic-pituitary-adrenal = (dt.) Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hrsg.	Herausgeber
HVA	Homovanillinsäure
Hz	Hertz
i. m.	intramuskulär
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
lat.	Lateinisch
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	(engl.) Least square mean = (dt.) kleinste Quadrate Mittelwert
Lx	Lux (Maß der Beleuchtungsstärke)
LW	Lebenswoche
m	Meter
M	molar
mg	Milligramm
MHC	(engl.) <i>Major Histocompatibility Complex</i> = (dt.) Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
MOPS	(3-(N-Morpholino)propansulfonsäure)
MR	Mineralcorticoid-Rezeptor

mRNA	(engl.) messenger RNA = (dt.) Boten-RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
n	Stichprobengröße (Anzahl der Tiere, Messungen, usw.)
N/L	Verhältnis Neutrophiler zu Lymphozyten
N.	Nervus
NA	Noradrenalin
NAc	(lat.) <i>Nucleus accumbens</i>
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NN	Nebennieren
O.D.	optische Dichte
p	p-Wert; Irrtumswahrscheinlichkeit, (engl.) p-level
PAMPs	(engl.) <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> = (dt.) konservierten molekulare Muster der Infektionserreger
PBMCs	(engl.) peripheral blood mononuclear cells = (dt.) mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PCR	(engl.) polymerase chain reaction = (dt.) Polymerase-Kettenreaktion
PFC	Präfrontaler Cortex
pg	Pikogramm
pH	Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
PHA	Phytohämagglutinin
phys.	physiologisch
PI	Proliferationsindex
PJ	Propidiumjodid
PRRs	<i>Pattern-Recognition Receptors</i>
PVN	paraventriculäre Nukleus des Hypothalamus
qPCR	(engl.) <i>real-time quantitative PCR</i> = (dt.) quantitative Echtzeit-PCR
R/M	Verhältnis von Rinden- zur Markfläche der Nebennieren
RNA	(engl.) <i>ribonucleic acid</i> = (dt.) Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	Reverse Phase
RPMI	(engl.) Roswell Park Memorial Institute = (dt.) RPMI- Medium
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunden
s.	siehe
S.	Seite
S	Speichel
SAM-Achse	Sympathikus-Adrenomedulläre-Achse
SE	Standardfehler
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin-B
SDS	(engl.) Sodiumdodecylsulfat = (dt.) Natriumdodecylsulfat
slgA	sekretorisches Immunglobulin A
SS	(engl.) side scatter = (dt.) Seitwärtsstreulicht
t	t-Wert
Tab.	Tabelle
TBP	(engl.) <i>TATA box binding protein</i> = (dt.) TATA-Box-Bindeprotein
TCGF	(engl.) <i>T cell growth factor</i> = T-Zell-Wachstumsfaktor
TCR	(engl.) <i>T cell receptor</i> = (dt.) T-Zell-Rezeptor
TfH	follikuläre T-Helferzellen
TGF	(engl.) <i>Transforming Growth Factor</i> = (dt.) transformierender Wachstumsfaktor
TH	T-Helfer
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidine-Enzymsubstrat
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
Treg-Zellen	regulatorische T-Zellen
u.a.	und andere(-s), unter anderem, unter anderen
UV	ultraviolett
v	vor Experiment, Basiswerte (Versuchsabschnitt Speichelproben)
VIS	(engl.) visible = (dt.) sichtbar
VU	Vollblutüberstand
VTA	(lat.) <i>ventral tegmental area</i> = (dt.) Ventrales Tegmentum
w	während des Experiments (Versuchsabschnitt Speichelproben)
Z	Zielzellen (NK-Zell-Assay)
z. B.	zum Beispiel
ZF	Zufällige Fütterung
ZKU	Zellkulturüberstand
ZL	Zufälliger Luftstoß

## Abbildungsverzeichnis

---

<b>Abb. 1.1</b>	HPA- und SAM-Achse im Überblick (modifiziert nach Glaser und Kiecolt-Glaser, 2005).	13
<b>Abb. 2.1</b>	Aufriss Versuchsstall im Tiertechnikum.	18
<b>Abb. 2.2</b>	Experimenteller und zeitlicher Ablauf.	21
<b>Abb. 2.3</b>	Histogramm für die durchflusszytometrische Zelldifferenzierung.	37
<b>Abb. 3.1</b>	Entwicklung der Körpergewichte innerhalb des Versuchs.	41
<b>Abb. 3.2</b>	Eiweißgehalt im Plasma.	43
<b>Abb. 3.3</b>	Leukozytenzahl.	44
<b>Abb. 3.4</b>	ACTH-Konzentrationen im Plasma.	48
<b>Abb. 3.5</b>	Cortisolkonzentrationen im Verlauf des Experiments.	49
<b>Abb. 3.6</b>	Genexpression von CRH und GR.	50
<b>Abb. 3.7</b>	Einfluss der Behandlungen auf das relative Nebennierengewicht, die Nebennierenfläche und das Verhältnis von Rinden- zu Markfläche.	50
<b>Abb. 3.8</b>	Einfluss der Behandlungsgruppen auf die Konzentration des Neurotransmitters NA im PFC und auf das Verhältnis von HIAA/5-HT im VTA.	53
<b>Abb. 3.9</b>	Lymphozytenproliferation der verschiedenen Behandlungsgruppen nach Mitogenzugabe.	56
<b>Abb. 3.10</b>	Immunglobulinkonzentrationen zum Start und zum Ende des Experiments.	57
<b>Abb. 3.11</b>	Ig-Konzentrationen der verschiedenen Behandlungsgruppen zum Start und zum Ende des Experiments.	58
<b>Abb. 3.12</b>	Differenzen der Ig-Konzentrationen der verschiedenen Behandlungsgruppen.	59
<b>Abb. 3.13</b>	IL-10-Konzentration im Vollblutüberstand.	60
<b>Abb. 3.14</b>	IL-10-Konzentration im Zellkulturüberstand.	60
<b>Abb. 3.15</b>	TNF- $\alpha$ -Konzentration im Vollblutüberstand.	61

<b>Abb. 3.16</b>	Beispielhafte Histogramm für die Zellgranularität und –größe zur Identifizierung der Zellen im NK-Zell-Assay für die Behandlungsgruppe FF.	62
<b>Abb. 3.17</b>	Beispielhafte Histogramme des Zytotoxizitätstests und der Niedrigkontrolle des NK-Zell-Assays zu Beginn des Versuchs für die Behandlungsgruppe FF.	63
<b>Abb. 3.18</b>	Ergebnisse des NK-Zell-Assays.	64
<b>Abb. 3.19</b>	Anteil Lymphozyten und Neutrophile für alle Behandlungsgruppen zusammen.	64
<b>Abb. 3.20</b>	Anteil Lymphozyten und Neutrophile für die jeweilige Behandlungsgruppe.	65
<b>Abb. 3.21</b>	Differenzen der Anteile an Lymphozyten und Neutrophilen für die jeweiligen Behandlungsgruppen.	66

## Tabellenverzeichnis

---

<b>Tab. 2.1</b>	Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien.	23
<b>Tab. 2.2</b>	Zusammensetzung der Ficoll-Diatrizoat-Gradienten I und II.	25
<b>Tab. 2.3</b>	Charakterisierung der verwendeten Primer in der qPCR.	30
<b>Tab. 2.4</b>	Sensitivität und Präzision der verwendeten ELISA-Tests.	34
<b>Tab. 2.5</b>	Differenzierung von porcinen Blutzellen im Differentialblutbild.	38
<b>Tab. 3.1</b>	Durchgangseffekte und Effekte des Zeitpunkts für den Eiweißgehalt.	42
<b>Tab. 3.2</b>	Übersicht Tiergesundheit.	45
<b>Tab. 3.3</b>	Durchgangseffekte auf die Parameter der HPA-Achse.	47
<b>Tab. 3.4</b>	Nebennieren.	51
<b>Tab. 3.5</b>	Durchgangseffekte auf die Neurotransmitter.	52
<b>Tab. 3.6</b>	<i>Least square means</i> der Konzentrationen der verschiedenen Neurotransmitter in den Hirnregionen NAc, PFC und VTA für die verschiedenen Behandlungen.	54
<b>Tab. 3.7</b>	Effekte des festen Faktors Durchgang auf die Parameter des Immunsystems.	55

## 1. Einleitung

---

### 1.1 Einführung

---

Immer mehr Verbraucher haben ein neues Bewusstsein für die Nutztierhaltung entwickelt. Sie möchten vor allem wissen, woher ihr Fleisch kommt und wie die Tiere zuvor gehalten wurden. Im Vordergrund stehen nun nicht mehr nur der Preis und der Geschmack des Fleisches, sondern auch die artgerechte Haltung, das Wohlbefinden und die Gesundheit der Tiere (Hemsworth, 2007; Napolitano et al., 2010). Laut einer Umfrage im März 2015, durchgeführt vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, sind 80 % der Deutschen bereit höhere Preise für Fleisch und Wurst zu bezahlen, wenn dadurch die Haltungsbedingungen verbessert werden. Es gibt immer mehr Initiativen, Organisationen und Unternehmen, die sich mit der Thematik Tierhaltung auseinandersetzen. Zudem ist im Tierschutzgesetz (TierSchG, 28.07.2014) und der Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung (TierSchuNutzV, 05.02.2014) der generelle Schutz der Gesundheit und des Wohlbefindens von Tieren sowie die verhaltensgerechte Haltung mit der Möglichkeit, Beschäftigungs- und Erkundungsverhalten ausführen zu können, verankert. Dieses gesellschaftliche Umdenken steht im Gegensatz zur Entwicklung des industriellen Fleischsektors in Deutschland, der von einer intensiven und weiterhin expansiven Massentierhaltung gekennzeichnet ist. Hohe Besatzdichten und geringes Platzangebot führen häufig zu negativen Belastungssituationen. Die Tiere sind gestresst. Studien zufolge wirkt chronischer Stress meist immunsuppressiv (Dhabhar, 2009, Dhabhar und Mc Ewen, 1997) und führt somit unter anderem zu einer erhöhten Infektanfälligkeit. Die Immunkompetenz sinkt. Umgekehrt ist aber auch bekannt, dass beim Menschen induzierte positive Stimmungen zu einem Anstieg der Immunglobulin A-Konzentrationen im Speichel (Hucklebridge et al., 2000), aber auch zu einem Anstieg der Zytokine Interleukin (IL)-2 und IL-3 führen können (Mittwoch-Jaffe et al., 1995) und folglich die Immunkompetenz erhöhen.

Bei Mensch und Tier können die emotionale Bewertung verschiedenster (Belastungs-) Situationen unterschiedlich ausfallen und somit auch die physiologischen Konsequenzen (z.B. Immunkompetenz) differieren (Stefanski, 1998). Diese Diversität von Emotionen steht im Mittelpunkt zahlreicher Studien, die sich mit dem Wohlbefinden von Tieren beschäftigen. Dass Emotionen als intensive und kurzlebige affektive Reaktionen auf ein Ereignis oder Stimulus von physiologischen und ethologischen Reaktionen begleitet werden, ist bekannt (Désiré et al., 2002). Wie aus Tiersicht Ereignisse bewertet werden und welche physiologischen Reaktionen diese Bewertung nach sich zieht, ist bisher kaum geklärt.

Diese Arbeit soll daher den Einfluss der wiederholten Antizipation von positiven oder negativen Stimuli auf die Immunkompetenz beim Hausschwein (*Sus scrofa domestica*) klären. Durch die wiederholte positive, negative oder konflikthaltige Antizipation sollen Änderungen der Stimmung induziert werden. Der Einfluss der induzierten Stimmungen auf das Immunsystem über das Neuroendokrinum wird durch die Erfassung von **Stressmarkern**, wie beispielsweise das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) und Cortisol, und von **Neurotransmittern** und deren Metaboliten sowie über ein breit gefächertes Spektrum an **Immunparametern**, wie das Differentialblutbild, Immunglobulin (Ig)- und Zytokinkonzentrationen, NK-Zellaktivität und Lymphozytenproliferation, untersucht. Es kann damit geprüft werden, ob die induzierten Stimmungen die Immunkompetenz der Tiere schwächen oder stärken und somit einen Einfluss auf das Wohlbefinden haben können.

## 1.2 Tierwohl und Wohlbefinden

---

Das Thema Tierwohl ist aktueller denn je. Verbraucher fordern es, Landwirte bemühen sich darum und Unternehmen werben damit. Doch das Thema wird kontrovers diskutiert, da einerseits die Wirtschaftlichkeit für die Landwirte von großer Bedeutung ist und Maßnahmen, die das Tierwohl verbessern, häufig mit vermehrten Kosten verbunden sind. Andererseits ist der Begriff Tierwohl schwer zu fassen und nicht leicht zu definieren. Allgemein geht man von drei wesentlichen Punkten aus, die für das Tierwohl entscheidend sind: Die Tiergesundheit, die Möglichkeit für die Tiere, ihren natürlichen Verhaltensweisen nachzugehen, und ihr Wohlbefinden. Die Grundlage für viele Bewertungssysteme bildet das vom „UK Farm Animal Welfare Council“ (FAWC) 1979 verfasste Konzept der „5 Freiheiten“: (1) Freiheit von Hunger und Durst, (2) Freiheit von Diskomfort, (3) Freiheit von Schmerz, Verletzung und Krankheit, (4) Freiheit normales Verhalten auszuüben sowie (5) Freiheit von Angst und Disstress. Erst seit Ende des 20. Jahrhunderts werden Tiere auch auf europäischer Gesetzesebene als empfindungsfähige Wesen angesehen, die besonderen Schutzes bedürfen (Duncan, 2006; Korte et al., 2007; Veissier et al., 2008). Auf wissenschaftlicher Ebene gibt es seither kein einheitliches Verständnis von Wohlbefinden bei Tieren. Broom (1991) definiert Wohlbefinden als den Status eines Individuums in Verbindung zu seiner Umwelt. Für Dawkins (1990) gehören die subjektiven Gefühle und somit die Abwesenheit von Leiden zum Begriff Wohlbefinden bei Tieren. Das Wohlbefinden kann aber auch als eine Zustandsgröße definiert werden, die die

psychischen und physischen Fähigkeiten eines Tieres, mit seiner Umwelt zurechtzukommen, beschreibt und die emotionale Bewertung mit einschließt (Puppe, 2003). Das Wohlbefinden ist daher stark an den emotionalen Status eines Tieres gebunden (Imfeld-Mueller et al., 2011). Es umfasst aber auch die Möglichkeit Erfahrungen zu machen, die mit positiven emotionalen Zuständen verknüpft sind (Boissy et al., 2007; Yeates und Main, 2008). Damit ist Wohlbefinden ein subjektiver Zustand, der sowohl aus komplexen, kognitiven Prozessen als auch aus emotionalen Wahrnehmungs- und Bewertungsmechanismen resultiert (Désiré et al., 2002; Mendl und Paul, 2004). Die Möglichkeit des Auslebens von ethologischen Bedürfnissen (Hughes und Duncan, 1988; Jensen und Toates, 1993; Studnitz et al., 2007) spielt für das Wohlbefinden ebenso eine Rolle wie Situationskontrolle, Vorhersehbarkeit von Ereignissen und erfolgreiche Bewältigung von Herausforderungen (Dantzer et al., 2002; Bassett und Buchanan-Smith, 2007; Puppe, 2003).

### 1.3 Stresskonzepte

---

Der Begriff Stress wird in vielen Lebens- und Wissenschaftsbereichen vor allem im negativen Sinne verwendet. Dabei ist die durch Stress hervorgerufene psychische und physische Reaktion vor allem eine Aktivierung und Anpassungsreaktion von Lebewesen an eine Anforderung und steht somit im Zusammenhang mit dem Wohlbefinden. Ob eine Anforderung als belastend oder positiv empfunden wird, hängt von der individuellen Bewertung des Organismus ab. Man unterscheidet somit den Disstress (negativ) vom Eustress (positiv). Die Effekte von psychischen Belastungen auf physische Funktionen wurde bereits durch den Physiologen Cannon Anfang des 20. Jahrhunderts (1929) tierexperimentell untersucht und als sogenannte Notfallreaktion beschrieben. Er beobachtete die Kampf-oder-Flucht-Reaktion von Tieren nach der Konfrontation mit einer belastenden Situation, die mit der Aktivierung des sympathischen Nervensystems bei gleichzeitiger Hemmung des parasympathischen Systems einherging. Selye (1936) erweiterte diesen Ansatz später um die längerfristige körperliche Veränderung nach Dauerstress. Erstmals unterschied er in Eustress, als einer notwendigen und positiv erlebten Aktivierung, und Disstress als einer belastend und schädlich wirkenden Reaktion auf ein Übermaß an Anforderung. Er beschrieb das Allgemeine Adaptationssyndrom (AAS), ein Reaktionsmuster des Körpers bei langanhaltendem Stress mit den drei Stadien Alarmreaktion, Widerstandsstadium und Erschöpfungsstadium. Nach Selye reagiert der Körper unspezifisch mit der gleichen Reaktionskette auf unterschiedliche Stressoren. Dabei kommt es in der ersten Phase zu einer vermehrten Ausschüttung von Stresshormonen (Adrenalin, A; Noradrenalin,

NA), die die Freisetzung von Glucocorticoiden (GCs), z.B. Cortisol, aus der Nebennierenrinde bewirken. Die Erhöhung der Herzfrequenz und des Blutzuckerspiegels sowie die Hemmung von Entzündungsreaktionen bewirken eine erhöhte Leistungsbereitschaft des Körpers. Im Widerstandsstadium versucht der Organismus sich an den Stressor anzupassen und den Normalzustand wieder herzustellen. Währenddessen lässt die Widerstandskraft gegenüber anderen Stressoren nach und es kann zu einer Schwächung des Immunsystems kommen. Tritt der einwirkende Stress chronisch auf, kann es in der Erschöpfungsphase zu organischen Erkrankungen, wie beispielsweise Magengeschwüren oder Bluthochdruck, kommen, im Extremfall die Erschöpfungsphase bis zum Tode führen. Selye konnte demnach die Bedeutung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HPA)-Achse für die Adaptation an akute oder chronische Stressoren darstellen. Dieses unspezifische Stresskonzept wurde von Mason 1971 modifiziert. Er gab zu bedenken, dass das AAS nur dann auftritt, wenn der Stressor den Organismus in einen emotional erregten Zustand versetzt. Die HPA-Achse wird demnach nur als Folge einer emotionalen Reaktion aktiviert und nicht aufgrund eines Stressors. Stress wird von Mason als spezifische Anpassungsleistung eines Organismus unter Einbeziehung der individuellen emotionalen Reaktionen definiert. Das Transaktionale Stressmodell von Lazarus, welches 1974 veröffentlicht wurde, misst dem individuellen Bewerten von Stresssituationen ebenfalls eine große Bedeutung bei. Stressoren können demnach unterschiedlich bewertet werden und somit auch unterschiedlich stark belasten. Lazarus beschreibt drei Arten der Bewertung: die primäre Bewertung (Ereigniseinschätzung), die sekundäre Bewertung (Ressourceneinschätzung) und die Neubewertung. Zudem führte er verschiedene Arten der Stressbewältigung (*Coping*) auf, die entweder problem-, emotions- oder bewertungsorientiert sein können.

Die bisher dargestellten Stresstheorien liegen dem Homöostase-Konzept zugrunde und basieren auf der Annahme, dass es für jeden Parameter im Körper ein optimales Niveau gibt, das durch lokale Mechanismen reguliert wird. Stress kann diese Homöostase bedrohen. Langfristige Konsequenzen in Bezug auf die Entwicklung von Krankheiten sind mit diesen Modellen schwer beschreibbar (Schulz et al., 2005). Das Konzept der Allostase von Sterling (1988) hat als zentralen Punkt die Veränderung als Garant für die Stabilität eines Systems. Das Gehirn koordiniert hierbei die Veränderungen, die sich auch im Verhalten bemerkbar machen können. Umgekehrt können allostatische Veränderungen auch antizipativ erfolgen. Allostatische Systeme passen, im Gegensatz zu homöostatischen Systemen, ihren Sollwert an die jeweiligen Anforderungen an und erzielen somit eine adaptive und protektive Reaktion. Die dauerhafte Aktivierung und somit die ständige Anpassung führt zur allostatischen Last, einer Abnutzungserscheinung aufgrund chronischer Überbelastung. Diese kann durch psychische

und physische Schäden deutlich werden. Beispielsweise kann der akute Anstieg von Stresshormonen die Gedächtnisleistung verbessern, der langfristige Anstieg jedoch die Gedächtnisleistung vermindern (Lupien, McEwen 1997). Außerdem können Erkrankungen des Stoffwechsels und des Immunsystems durch eine chronische Belastung begünstigt werden.

## 1.4 Das Immunsystem

---

Um die Beeinflussung des Immunsystems durch Stress klären zu können, soll zunächst das Immunsystem genauer betrachtet werden.

Mikroorganismen, körperfremde Substanzen sowie körpereigene entartete Zellen werden vom Immunsystem erkannt, bekämpft und unschädlich gemacht (Kennedy, 2010). Die Abwehr von potentiellen Erregern erfolgt über die angeborene und die adaptive Immunität. Beide Arme des Immunsystems zeichnen sich durch die Beteiligung von humoralen und zellulären Prozessen aus und sind über verschiedene humorale oder zelluläre Komponenten miteinander verbunden. Dieses Zusammenspiel ermöglicht die Abwehr von Erregern auf extra- und intrazellulärer Ebene.

Die **angeborene Immunität** (oder auch innate) ist phylogenetisch älter und ist durch eine universelle und schnelle Abwehr (Minuten bis Stunden) von verschiedenen Pathogenen gekennzeichnet (Beutler, 2004; Staros, 2005). Die **adaptive Immunität** (oder auch erworbene) hingegen zeichnet sich durch eine größere Spezifität und eine geringere Geschwindigkeit bei der Abwehr (Tage) im Vergleich zur angeborenen Immunität aus (Kennedy, 2010; Toskala, 2014).

Häufig werden zur **angeborenen Immunität** auch die physikalischen, chemischen und mikrobiologischen Barrieren gezählt. Die direkte Abwehr von Erregern erfolgt aber vor allem durch die im Blut zirkulierenden und im Gewebe sitzenden Zellen, das Komplementsystem und die Zytokine (Delves und Roitt, 2000). Dringen Mikroorganismen über die äußeren Barrieren ein, erkennen Gewebsmakrophagen (Vorläufer im Blut sind Monozyten) und Mastzellen die konservierten molekularen Muster der Infektionserreger (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) als Gefahr (Medzhitov und Janeway, 2000). Beispiele hierfür sind Komponenten der Zellwände von Bakterien (Lipopolysaccharide, LPS). PAMPs werden durch die *Pattern-Recognition Receptors* (PRRs) erkannt, zu denen auch die Gruppe der Toll-like

Rezeptoren (TLRs) gehören (Muzio et al., 2000). Nach der Erkennung werden die Erreger von den Makrophagen phagozytiert und verdaut oder durch die Freisetzung von toxischen Substanzen (Sauerstoffradikalen) durch Mastzellen beschädigt. Zudem steht das Komplementsystem (humorale Abwehr) in den extrazellulären Flüssigkeiten bereit und kann über den alternativen oder den Lektin-Weg (Medzhitov und Janeway, 2000) sofort aktiviert werden. Folglich kommt es zur Opsonisierung oder zur direkten Lyse durch den Membran-Attacke-Komplex. Reicht diese erste Abwehr nicht aus, setzen die aktivierten Makrophagen, aber auch Mastzellen, proinflammatorische Zytokine (z.B. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) frei und lösen somit eine Entzündungsreaktion aus. Leukozyten (z.B. Neutrophile) werden mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Chemokinen rekrutiert. Zunächst wird durch die Freisetzung der Zytokine die Expression von Adhäsionsmolekülen (Membranproteine auf der Zelloberfläche, die u.a. Zell-Zell-Interaktionen vermitteln; Aplin et al., 1999) auf den Endothelzellen und den Neutrophilen erhöht, um die Haftung der Zellen an den Wänden der Blutgefäße zu verbessern. Anschließend migrieren die Neutrophilen entlang eines Gradienten von Fragmenten des Komplementsystems und Chemokinen zwischen die Endothelzellen und wandern ins Gewebe (Diapedese; von Andrian und Mackay, 2000). Die über die Chemotaxis an den Ort der Entzündung geleiteten Neutrophilen phagozytieren und töten den Erreger. Die Phagozytose und das Abtöten eines Erregers sind 100mal effektiver, wenn dieser zuvor mit spezifischen Antikörpern oder Komplementfaktoren opsonisiert wurde. Insbesondere eingekapselte Organismen, wie *Pneumococcus* und *Haemophilus*, können erst von den Neutrophilen phagozytiert werden, wenn deren Oberfläche mit Antikörpern markiert wurde (Parkin und Cohen, 2001). Parasitäre Infektionen werden durch die eosinophilen Granulozyten abgewehrt. Diese Infektionen induzieren die Freisetzung des Immunglobulins E. IgE bindet an der Oberfläche der Parasiten. Die Eosinophilen können daraufhin an den Antikörper binden und zytotoxische Substanzen sezernieren (Parkin und Cohen, 2001). Außerdem spielen Eosinophile und Mastzellen eine Rolle bei Allergien. Sowohl Mastzellen (im Gewebe) aber auch die basophilen Granulozyten (im Blut) besitzen hoch affine Rezeptoren für IgE (Parkin und Cohen, 2001). Die Vernetzung dieser Rezeptoren über die Bindung eines Antigens führt zur Degranulierung der Zellen und die Freisetzung von Mediatoren wie beispielsweise Histamin, Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) u.a. und können somit neben einer allergischen Reaktion auch eine Entzündungsreaktion auslösen. Die Basophilen sind zusätzlich an der Abwehr von Parasiten beteiligt. Virale Infektionen werden vom angeborenen Immunsystem durch die natürlichen Killer (NK)-Zellen abgewehrt, aber auch abnorme Zellen (z.B. Tumorzellen) oder Antikörper-markierte Zellen können durch NK-Zellen erkannt werden. Auf ihrer Oberfläche befinden sich einerseits Immunglobulin-Rezeptoren, die Antikörper-markierte

Zellen binden und diese dann Antikörper-spezifisch zytotoxisch töten. Außerdem besitzen sie Rezeptoren für den MHC-Klasse-I-Komplex (*Major Histocompatibility Complex*, Haupthistokompatibilitätskomplex). Da gesunde Zellen den MHC-Klasse-I-Komplex besitzen, werden Zellen ohne dieses Signalprotein (Tumorzellen und virusinfizierte Zellen) durch die NK-Zellen mittels Perforinen und Granzymen lysiert und es kommt zur Apoptose der Zellen (Parkin und Cohen, 2001).

Die **adaptive Immunantwort** wird zeitlich parallel zu den beschriebenen Entzündungsvorgängen durch dendritische Zellen (DCs) induziert. Die DCs, Zellen des angeborenen Immunsystems, nehmen ständig Substanzen aus ihrer Umgebung auf, werden aber erst durch die Aufnahme von Erregern aktiviert. Sie regulieren dann ihre PRRs herunter und wandern vom Gewebe über den Lymphstrom in die Lymphknoten und prozessieren währenddessen die aufgenommenen Antigene. Anschließend exprimieren sie sie in Form von MHC-II/Peptid-Komplexen in sehr hoher Dichte auf ihrer Zelloberfläche und verstärken die Expression von kostimulatorischen Molekülen (z.B. CD80 und CD86, CD für *cluster of differentiation*). In den Lymphknoten angekommen, präsentieren sie dort den naiven CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten die Antigene. Die dendritischen Zellen sind zu Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) differenziert. Weitere APZ sind Makrophagen, Monozyten und B-Zellen, auch sie prozessieren aufgenommene Antigene und präsentieren diese über MHC-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Für die adaptive Immunantwort ist die Bindung von Antigenen über spezifische Rezeptoren auf den T- und B-Zellen charakteristisch. Die T-Lymphozyten vermitteln dabei die zelluläre adaptive Immunantwort und erkennen Antigene über spezifische T-Zellrezeptoren (*T cell receptor*, TCR; Hall et al., 1965). Die TCR-vermittelte Antigenerkennung ist für naive CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten verschieden. CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten können Antigene nur erkennen, wenn diese von MHC-II-Komplexen präsentiert werden (siehe oben). CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten hingegen benötigen eine Antigenpräsentation über MHC-I-Komplexe, die sich auf allen kernhaltigen Zellen befinden. Ist das Antigen über den TCR erkannt und werden costimulatorische Signale über CD80 oder CD86 auf CD28 der T-Zellen übermittelt, werden die T-Lymphozyten aktiviert. Sie teilen sich, bilden einen Klon und differenzieren sich zu T-Effektorzellen oder T-Gedächtniszellen. T-Effektorzellen können CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen (TH1, TH2, T<sub>H</sub>17, Treg, TH9, TH22) oder zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (*cytotoxic T lymphocyte*, CTL) sein (Ivanova und Orekhov, 2015). Die DC können über die Ausschüttung von Zytokinen die Differenzierung der T-Helferzellen beeinflussen. Wurden die DCs durch bakterielle und virale Komponenten aktiviert, produzieren sie IL-12 und fördern somit die TH1-Zelldifferenzierung. Die TH1-Zellen werden charakteristischerweise als Vermittler der zellulären Antwort bezeichnet und schütten die Zytokine IL-2, TNF- $\alpha$  und Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ; Newport et al.,

1996) aus, wodurch wiederum die Aktivierung und Differenzierung der Makrophagen sowie die Aktivierung der CTL (CD8<sup>+</sup>) und NK-Zellen erfolgt. So können vor allem intrazelluläre Pathogene, wie beispielsweise Viren, abgewehrt werden. Tritt eine Infektion mit extrazellulären Pathogenen auf, schütten die DCs vermehrt IL-4 aus und bewirken somit eine verstärkte antigenspezifische TH2-Antwort. Die TH2-Zellen vermitteln die humorale Antwort gegen externe Pathogene und sezernieren die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 u.a., welche die Mechanismen der TH1-Antwort hemmen. Infolgedessen werden B-Lymphozyten aktiviert und deren Proliferation und Differenzierung angeregt. Das sezernierte IL-4 fördert den Isotypen-Wechsel zu IgE in B-Zellen. Zusätzlich werden die Mastzellen, die basophilen und eosinophilen Granulozyten stimuliert. Dendritische Zellen, die unreif bleiben, wirken antiinflammatorisch über die Ausschüttung von IL-10 und den transformierenden Wachstumsfaktor beta (*Transforming Growth Factor*  $\beta$ , TGF- $\beta$ ). Die T-Zellen können nicht zu T-Helferzellen differenzieren, sie werden zu regulatorischen T-Zellen (Treg) und wirken immunsuppressiv (Swain et al., 1991). Nach der Aktivierung der T-Zellen wandern diese aus den lymphoiden Geweben über Blutgefäße zum Ort der Entzündung. Ein Teil der aktivierten T-Zellen verbleibt innerhalb der Lymphknoten und wird zu Gedächtniszellen.

Bestimmte mikrobielle Toxine, zum Beispiel Enterotoxine von Staphylokokken (SEB), sind sehr potente Aktivatoren von T-Lymphozyten und werden daher Superantigene genannt. Sie umgehen die Antigenprozessierung und -präsentation indem sie MHC-II und TCR direkt vernetzen.

Über die B-Lymphozyten wird die adaptive humorale Immunantwort vermittelt. Die Antigene werden spezifisch über die B-Zellrezeptoren (*B cell receptor*, BCR, membrangebundener Antikörper) erkannt. Dies kann T-Zell-unabhängig und T-Zell-abhängig erfolgen (Parkin und Cohen, 2001). Die T-Zell-abhängige Immunantwort wird über das membranständige IgM (ebenfalls ein BCR) der B-Zellen vermittelt. Das Antigen wird über den BCR gebunden, prozessiert und über die MHC-II-Komplexe auf der Zelloberfläche der B-Zellen exprimiert. Das Antigen wird anschließend spezifischen T-Zellen präsentiert, die wiederum über Zytokine (z.B. *B cell growth factor*, BCGF) die B-Zellen aktivieren können. Es folgt die Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen, die spezifisch Antikörper synthetisieren und sezernieren. Durch die Bildung weiterer antigenspezifischer Zellen (klonale Proliferation) können die Pathogene spezifisch abgewehrt werden (Roitt, 1988). Die primäre Antikörperantwort wird durch IgM dominiert, erst in der späten Phase kommen andere Ig-Klassen hinzu. Ein Teil dieser aktivierten B-Zellen werden zu Gedächtniszellen und ermöglichen eine schnellere Immunantwort bei der sekundären Infektion. Die T-Zell-unabhängige Immunantwort der B-Zellen (Mond et al., 1995)

wird durch Antigene, wie Polysaccharide, ausgelöst. Diese binden über mehrere Epitope an mehrere BCRs, aktivieren die B-Zellen direkt und lösen die sofortige Freisetzung von IgM aus. Es finden kein Klassenwechsel der Immunglobuline und keine Bildung von Gedächtniszellen statt. Die T-Zell-unabhängige Immunantwort ist auf die Sekretion von IgM limitiert, gering spezialisiert und sehr kurzlebig.

Die für die humorale Abwehr des adaptiven Immunsystems charakteristischen Antikörper neutralisieren Toxine, opsonisieren, aktivieren das Komplementsystem und markieren Zellen, um deren Tötung durch NK-Zellen zu ermöglichen (eine Auswahl der Antikörperfunktionen). Sie lassen sich in fünf verschiedene Immunglobulinklassen unterteilen, die sich in ihrer Struktur, Verteilung und Funktion unterscheiden. Das IgA kommt auf den äußeren Oberflächen, z.B. Schleimhäuten, vor und wird sezerniert. Die wichtigste Funktion des IgA ist die Neutralisation von Pathogenen, indem die Bindung an Zellen durch die IgA-Moleküle blockiert wird. IgD kommt auf der Oberfläche von B-Zellen vor, seine Funktion ist bisher jedoch unbekannt. IgG ist die am häufigsten vorkommende Ig-Klasse. Die Monomere sind aufgrund ihrer geringen Größe von 150 kDa in der Lage, sich über Gewebe zu verbreiten und beim Menschen die Plazenta zu passieren, jedoch nicht bei Schweinen. In Folge einer Immunabwehrreaktion wird IgG verzögert gebildet und hat mit drei Wochen die längste Halbwertszeit der Immunglobuline. IgE bindet an Mastzellen und eosinophile Granulozyten. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Parasiten, wie beispielsweise Würmern, sowie bei der allergischen Reaktion vom Soforttyp (z.B. Heuschnupfen). Alle naiven B-Zellen tragen IgM als B-Zellrezeptor auf ihrer Oberfläche. Es ist daher auch das erste Immunglobulin, das im Verlaufe einer Immunantwort sezerniert wird. IgM ist ein 1100 kDa großes Pentamer, das sich hauptsächlich im Blut befindet und die klassische Komplementaktivierung effektiv auslösen kann.

## 1.5 Antizipation und Stimmungen

---

Neben der Einschätzung der Tiergesundheit soll zudem der affektive Status des Tieres erfasst werden. Die Verwendung der Begriffe Affekt und Emotion erfolgt in der Literatur nicht immer einheitlich, zum Teil sogar synonym. Der Affekt wird aber mitunter als eine im Gegensatz zur Emotion unbewusste, da subcortical stattfindende, neurophysiologische Reaktion auf ein Ereignis beschrieben. Erst durch die Interpretation des Ereignisses auf neocorticaler Ebene

entsteht eine subjektive Wahrnehmung, die als Emotion bezeichnet wird und eine ethologische, eine physiologische und eine subjektive Komponente aufweist (Désiré et al., 2002). Emotionen können demnach als intensive, kurzlebige affektive Reaktionen auf einen Stimulus oder ein Ereignis definiert werden, die von physiologischen und ethologischen Reaktionen begleitet werden (Désiré et al., 2002). Langlebige affektive Reaktionen hingegen werden als Stimmungen bezeichnet, die im Gegensatz zu Emotionen mehrere Minuten oder Stunden andauern können (Lazarus, 1994). Neben der kürzeren Dauer (Watson und Clark, 1994) unterscheiden sich damit Emotionen von Stimmungen durch ihre stärkere Intensität (Clore, 1994) und sind meist auf bestimmte Auslöser zurückführbar. Stimmungen sind subjektiver (Ekman, 1999; Alpert und Rosen, 1990).

Generell sind affektive Zustände durch eine bestimmte Valenz, also Wertigkeit zwischen positiv und negativ bzw. angenehm und unangenehm, und durch einen gewissen Grad der Erregung gekennzeichnet (Posner et al., 2005; Yeates und Main, 2008). Die affektive Reaktion, insbesondere die Erregungskomponente, ist ethologisch und physiologisch erfassbar.

Positive Stimmungen werden mit der Freisetzung von Dopamin (DA) im Gehirn assoziiert. Die dopaminergen Signalwege spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von positiven Stimmungen (Ashby et al., 1999; Mitchell, Phillips, 2007). Zu ihnen gehören der mesolimbische Signalweg, der seinen Ursprung im ventralen Tegmentum (*ventral tegmental area*, VTA) hat und auf das limbische System über den *Nucleus accumbens* (NAc), die Amygdala, den Hippocampus und den olfaktorischen Tuberkel projiziert (Xie et al., 2009; Mitchell, Phillips, 2007). Er ist entscheidend für die Funktionalität des „Belohnungssystems“ (Eckart, Bunzeck, 2013). Außerdem ist der mesocorticale Weg von Bedeutung und entspringt ebenfalls im VTA, projiziert aber zum Präfrontalen Cortex (PFC) und umliegenden Strukturen (Mitchell, Phillips, 2007). Exekutive Funktionen sowie die Motivation werden so beeinflusst. Negative Stimmungen sind äußerst komplex und nicht einfach nur das Gegenteil von positiven Stimmungen. Nicht nur geringe DA-Konzentrationen, die durch einen stressbedingten erhöhten Umsatz von DA erreicht werden, sondern auch der Mangel an 5-HT oder seiner Vorstufe, der Aminosäure Tryptophan, werden mit negativer Stimmung in Verbindung gebracht (Asbhy et al., 1999). Im Gegensatz zu dieser Annahme zeigten Untersuchungen von Tomie et al. (2004), dass die aversive Stimulation oder Stressoren die Freisetzung von Corticosteroiden bewirken, die häufig mit einem Anstieg der NA- und 5-HT-Konzentrationen im PFC einhergehen.

Regelmäßig sich wiederholende negative oder positive emotionale Erfahrungen können nachweislich anhaltende Veränderungen der Stimmung bewirken (Paul et al., 2005; Dudink et

al., 2006; Boissy et al., 2007; Matheson et al., 2008; Mendl et al., 2009). Die Antizipation solcher Erfahrungen ist in der Lage, Emotionen und Stimmungen zu induzieren. Der Begriff Antizipation ist psychologisch gesehen das Vermögen, ein Ereignis sowie sein Ausbleiben mit den dazugehörigen Auswirkungen vorherzusehen (Weiss, 1971; Arthur, 1987; Wiepkema und Koolhaas, 1992). Über eine Pawlowsche Konditionierung kann eine affektive Reaktion ausgelöst werden, die in der Ausprägung von Emotionen mündet. Tiere können so lernen, einen positiven oder negativen Reiz zu erwarten, nachdem ein neutraler Reiz wahrgenommen wurde. Die darauf folgende emotionale Antwort wird durch ethologische und physiologische Änderungen deutlich. Wie bereits erwähnt, spielt die Vorhersehbarkeit von Ereignissen eine wichtige Rolle für das Wohlbefinden bei Tieren. Untersuchungen an Schweinen konnten bereits zeigen, dass die positiven Effekte einer angereicherten Umwelt ausgeprägter sind, wenn die Anreicherung angekündigt erfolgte (Dudink et al., 2006, Imfeld-Mueller et al., 2011).

## 1.6 Beeinflussung des Immunsystems durch Stress und Stimmungen

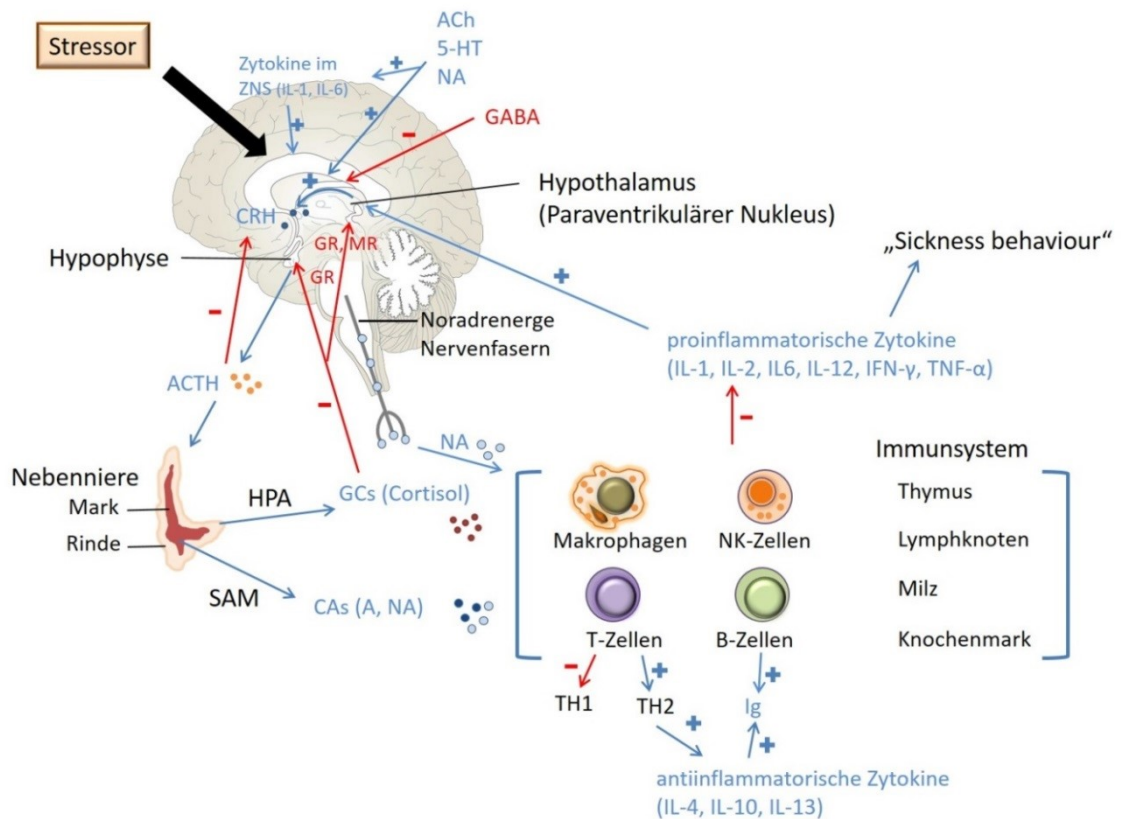
---

Studien konnten belegen, dass chronischer Stress meist immunsuppressiv wirkt (Dhabhar, 2009, Dhabhar und Mc Ewen, 1997) und demzufolge Menschen und Tiere gleichermaßen veränderte Leukozytenzahlen (Dhabhar, 2002; Davis et al., 2008) sowie eine zunehmende Infektanfälligkeit aufweisen. Im Gegensatz dazu konnte vor allem an Ratten und Mäusen gezeigt werden, dass akuter Stress eine Verstärkung der Immunabwehr, beispielsweise eine gesteigerte Lymphozytenproliferation und NK-Toxizität, bewirken kann (Dhabhar, 2000, 2014). Außerdem geht eine Aktivitätssteigerung der NK-Zellen mit einem Anstieg des DAs im Blut einher (Matsunaga et al., 2008). Der Einsatz von positiven Erfahrungen, beispielsweise die Anreicherung der haltungsbedingten Umwelt, konnte nachweislich das Tumorwachstum bei Mäusen verringern und die Remission verbessern (Cao et al., 2010). Die positive oder negative Modulation des Immunsystems über Verhaltenseffekte ist durch das komplexe Zusammenspiel von Nerven-, Hormon- und Immunsystem selbst möglich. Das Immunsystem reagiert dabei auf Signale des Nerven- und Hormonsystems (Ader et al., 1995). Es ist aber auch bekannt, dass Produkte des Immunsystems Funktionen des Nerven- und Hormonsystems beeinflussen können (Besedovsky und Sorkin, 1977; Blalock, 1989).

Auf **neuraler Ebene** werden als erste Reaktion auf psychische oder physikalische Stressoren die Sympathikus-Adrenomedulläre (SAM-) Achse aktiviert und daraufhin die Katecholamine A und

NA aus den Nebennieren freigesetzt (Glaser und Kiecolt-Glaser, 2005). Zusätzlich erfolgt die Freisetzung von NA über noradrenerge sympathische Nervenfasern, um die Funktion von Immunzellen zu beeinflussen (Abb. 1.1). Da sympathische Nervenfasern die primären und sekundären lymphatischen Organe innervieren, ist eine Neurotransmission zwischen Gehirn und Immunsystem möglich (Felten und Felten, 1991). Rezeptorstudien zeigten, dass sich alpha- und beta-adrenerge Rezeptoren auf T- und B-Lymphozyten sowie auf Makrophagen befinden. NA bindet beispielsweise an  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren auf Lymphozyten im Thymus und hemmt somit die Mitose der Thymozyten und verstärkt die T-Zell-abhängige Immunantwort sowie die Aktivität zytotoxischer T-Zellen (Stevens-Felten, Bellinger, 1997). Serotonerge und dopaminerge Rezeptoren konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Immunzellen sind nachweislich in der Lage, Neurotransmitter wie 5-HT und DA zu synthetisieren. Die Kommunikation zwischen Nerven- und Immunsystem ist demnach bidirektional. Die negative Rückkopplung des Immunsystems erfolgt über die Ausschüttung von Zytokinen, die einerseits lokal die neurale Transmitterfreigabe des lymphatischen Gewebe beeinflussen, sowie andererseits zentral über den Vagus-Nerv vermittelt werden (Stevens-Felten, Bellinger, 1997) und verbindet so periphere Immunreaktionen mit dem Gehirn. Es wird somit klar, dass eines der Systeme funktional nicht aktiv sein kann, ohne die Aktivität des anderen zu beeinflussen.

Bereits bevor die sympathische Innervation des lymphatischen Gewebes erkannt wurde, war der Zusammenhang von Läsionen im Gehirn, insbesondere im Hypothalamus und im limbischen System, und immunologischen Konsequenzen bekannt (Felten et al., 1991). Es konnte gezeigt werden, dass Läsionen im Hypothalamus zu verringerten Zellzahlen in Milz und Thymus führen und dass die Mitogen-induzierte T-Zell-Proliferation und die NK-Zell-Zytotoxizität gehemmt werden. Diese Effekte basieren auf neuroendokrinen Änderungen (Ader et al., 1995).



**Abb. 1.1 HPA- und SAM-Achse im Überblick (modifiziert nach Glaser und Kiecolt-Glaser, 2005).** Stress aktiviert die Sympathikus-Adrenomedulläre (SAM-) und Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HPA-) Achse und bewirkt gleichzeitig regulierende negative Rückkopplungsprozesse. Die Endprodukte beider Achsen, Katecholamine (CAs) und Glucocorticoide (GCs), wirken inhibierend auf die proinflammatorische Abwehr und erreichen eine Verschiebung in Richtung humoraler Antwort. Akuter Stress aktiviert zuerst die SAM-Achse und etwas verzögert die (HPA)-Achse. Es werden über die SAM-Achse die Katecholamine Adrenalin (A) und Noradrenalin (NA) aus dem Nebennierenmark, aber auch aus noradrenergen Nervenfasern des sympathischen Nervensystems, freigesetzt. Die Aktivierung der HPA-Achse hat die Freisetzung des Corticotropin-freisetzenden Hormons (CRH) aus den Neuronen des paraventriculären Nucleus im Hypothalamus zur Folge, welches wiederum die Freisetzung des ACTH aus der Hypophyse bewirkt. ACTH regt die Rinde der Nebennieren an, GCs zu bilden und zu sezernieren. Die GCs haben als Endprodukt der HPA-Achse einen großen regulatorischen Einfluss auf Zellen und Organe des Immunsystems. Sowohl die GCs als auch die CAs werden über Rezeptoren auf den Immunzellen und dem lymphatischen Gewebe gebunden und hemmen somit die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und fördern antiinflammatorische Zytokine. Die Immunantwort wird durch die Verschiebung von TH1 zu TH2-Zellen in Richtung humoraler Abwehr gelenkt. Die TH2-Zellen fördern über antiinflammatorische Zytokine die Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen.

Der **endokrine** Einfluss auf Immunfunktionen kann somit nicht komplett separat vom neuronalen Einfluss dargestellt werden, da, wie bereits erwähnt, eine multifaktorielle Kommunikation zwischen den verschiedenen Systemen stattfindet. Der Hypothalamus ist dabei die wichtigste Schnittstelle zwischen dem neuronalen und dem endokrinen System, während die hormonelle Umsetzung in der Hypophyse stattfindet. Die Aktivierung der **HPA-Achse** erfolgt als eine verzögerte Reaktion auf Stress (McEwen und Sapolsky, 1995). Die Verarbeitung der

psychischen oder physischen Stressoren auf cerebraler Ebene führt dazu, dass Neuronen des paraventriculären Nucleus (PVN) im Hypothalamus die Neurohormone Corticotropin-freisetzendes Hormon (CRH) und Arginin-Vasopressin (AVP) in den hypophysären Portalkreislauf ausschütten und diese dann vom Hypothalamus zur Hypophyse gelangen (Whitnall, 1993). Die Freisetzung des CRHs wird durch zahlreiche Substanzen reguliert. So steigt die CRH-Ausschüttung durch die Neurotransmitter Acetylcholin, NA und 5-HT, während  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) hemmend wirkt. Auch einige Zytokine, wie beispielsweise IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ , bewirken eine verstärkte Ausschüttung des CRHs. Diese Zytokine können zentral, als Reaktion auf einen Stressor, ausgeschüttet oder peripher von Immunzellen sezerniert worden sein (Abb. 1.1, Glaser und Kiecolt-Glaser, 2005). Sowohl CRH als auch AVP initiieren die ACTH-Produktion und -Sekretion in den systemischen Blutkreislauf. Darauf folgend werden GCs (z.B. Cortisol) in der Nebennierenrinde synthetisiert und freigesetzt (von Holst, 1998). Die vermehrte Ausschüttung von GCs dient der Energiebereitstellung, der Erhöhung der Herzfrequenz und der Suppression von Immun- und Entzündungsprozessen (Sapolsky et al., 2000). Die GCs können über Rezeptoren auf den Immunzellen deren Proliferation fördern (Neutrophilenzahl geht hoch) oder hemmen (Anzahl an Eosinophilen, Basophilen, Monozyten und Lymphozyten gesenkt) und somit auch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  u.a.) inhibieren (Dhabhar, 2002). Neben dem Einfluss auf die Leukozytenverteilung durch die veränderte Expression von Adhäsionsmolekülen (Cronstein et al., 1992; Perretti et al., 1996; Nakagawa et al., 1999) können GCs sowohl die Aktivierung von T-Zellen (Boumpas et al., 1991; Paliogianni et al., 1993; Vacca et al., 1992) als auch die Produktion von T-Zell-aktivierenden Zytokinen, wie IL-4 und IFN- $\gamma$ , inhibieren (Arya et al., 1984; Wu et al., 1991). Die GC-vermittelte Inhibition der Mitogen- oder Antigen-induzierten T-Lymphozytenproliferation wird vermutlich über die Hemmung der Produktion des T-Zell-Wachstumsfaktors (*T cell growth factor*, TCGF) induziert (Gillis et al., 1979). Zudem kann durch GCs T-Zell-Apoptose (Tuckermann et al., 2005) oder der Fortbestand induziert werden, dies ist jedoch abhängig vom T-Zelltyp und vom Differenzierungsstadium (Zacharchuk et al., 1990; Ashwell et al., 2000). Studien konnten zeigen, dass nicht nur die GCs, sondern auch die Katecholamine A und NA eine Verschiebung von TH1- in Richtung TH2-Zellen bewirken (Elenkov und Chrousos, 1999) und somit verstärkt antiinflammatorische Zytokine gebildet werden (Glaser et al., 2001). Diese fördern wiederum die verstärkte Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen und folglich eine vermehrte Antikörperproduktion. Die Immunantwort wird in Richtung humorale Abwehr gelenkt. Immunsuppressive Wirkungen werden erst durch eine hohe Konzentration an GCs erreicht. Physiologische Konzentrationen bewirken hingegen die Aufrechterhaltung der Immunfunktionen oder haben sogar

verstärkende Effekte auf die Immunfunktion (Dhabhar, 2009). Das von den Nebennieren freigesetzte Cortisol hemmt über eine negative Rückkopplung den Hypothalamus und die Hypophyse und somit auch die Synthese und Freisetzung von CRH und ACTH. Das Cortisol kann im Gehirn über zwei verschiedene Rezeptoren, sogenannte Transkriptionsfaktoren, gebunden werden: den Glucocorticoid-Rezeptor (GR) und den Mineralcorticoid-Rezeptor (MR). Cortisol bindet mit einer höheren Affinität an die MRs, und initiiert somit die Stressantwort (Ratka et al., 1989; Oitzl et al., 1995; Gesing et al., 2001). Zudem werden über die MRs circadiane Schwankungen des Cortisolgehalts im Blut reguliert. Da der GR eine niedrige Affinität zu GCs aufweist (Reul und de Kloet, 1985), ist die sättigende Bindung des Cortisols erst bei sehr hohen Konzentrationen im Blut möglich. Die Stressreaktion wird beendet. Die Genexpression von GR und MR wird beim Schwein vermutlich durch Stress in der frühen Entwicklungsphase beeinflusst (Kanitz et al., 2011). So konnte ein Anstieg der MR-Genexpression im Hippocampus bei Ferkeln in der Absetzphase beobachtet werden. Der Einfluss dieser Änderungen auf die spätere Gesundheit der Tiere muss erst noch untersucht werden.

Sollte der Stress über einen längeren Zeitraum anhalten, kann die Hemmung proinflammatorischer Zytokine durch eine Ermüdung der HPA-Achse vermindert werden (Tian et al., 2014). Die chronisch erhöhten GC-Konzentrationen führen dann zu einem 5-HT-Mangel, da vermehrt IFN- $\gamma$  gebildet wird und folglich der Abbau von Tryptophan in Kynurenin gefördert wird (Kynurenin-Weg). Es liegt dann eine höhere Konzentration des Abbauprodukts von 5-HT, der 5-Hydroxyindolylelessigsäure (5-HIAA), vor. Die konstant hohen GC-Konzentrationen führen zur Apoptose von Neuronen im Hippocampus und schädigen so das Gewebe, was wiederum eine verstärkte Aktivierung der HPA-Achse zur Folge hat.

Durch pathogen- und stressinduzierte Zytokinausschüttung (z.B. IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6) kann das **Verhalten** beeinflusst werden. Kranke Tiere oder Menschen verlieren ihren Appetit, werden lethargisch und schläfrig, meiden sozialen Kontakt und haben ein verstärktes Schmerzempfinden. Diese Krankheitssymptome auf der Verhaltensebene, zusammen mit Fieber, werden auch als „*sickness behaviour*“ zusammengefasst, und wurden von Hart (1988) als eine hoch organisierte Strategie des Organismus bezeichnet, um Pathogene und Infektionen abzuwehren und so das Überleben zu sichern. Durch dieses evolutionär vorteilhafte Verhalten wird beispielsweise eine wärmere Umgebung bevorzugt und erneuter Kontakt mit anderen infizierten oder aggressiven Artgenossen und somit eine zusätzliche Infektion und Belastung des Körpers vermieden. Gleichzeitig werden Artgenossen vor der Übertragung einer Infektion geschützt. Die Proliferation von Immunzellen wird durch die erhöhte Körpertemperatur angeregt, während Pathogene in ihrer Vermehrung gehemmt

werden. Der direkte Zusammenhang zwischen steigenden Zytokinkonzentrationen und dem beschriebenen Krankheitsverhalten konnte durch zahlreiche *in vitro*-Studien nachgewiesen werden. So bewirkte die Gabe von IL-1 den Anstieg von Acetylcholin, wodurch wiederum das Schmerzempfinden gesteigert wird. Zytokine werden vom Gehirn als internes Krankheitssignal interpretiert (Besedovsky und del Rey, 2002; Dantzer, 2001). Das kranke Individuum bewertet seine Bedürfnisse und Prioritäten neu und die darauf folgende Reorganisation wird durch Zytokine peripher und zentral gesteuert. Auf der anderen Seite kann die Veränderung des Verhaltens aufgrund der Änderungen des emotionalen Zustands (z. B. **Stimmungen**) das Immunsystem beeinflussen. Beispielsweise führen die Isolation oder elektrische Stromstöße bei Ratten zur Aktivierung der ersten Immunantwort der akuten Phase. Die Tiere bekommen Fieber und reagieren wie nach einer Pathogenexposition (Hennessy et al., 2001; LeMay et al., 1990, Milligan et al., 1998). Bei Menschen konnte ein Zusammenhang zwischen der klinischen Depression und dem Anstieg zirkulierender Neutrophilenzahlen sowie der Abnahme von NK-Zellen, T- und B-Lymphozyten und zytotoxischen T-Zellen gezeigt werden. Zudem wurde beobachtet, dass bei einer klinischen Depression die Aktivität der NK-Zellen und die Mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation reduziert sind (Ader et al., 1995).

## 1.7 Zielstellung der Arbeit

---

Die Bewertung von sich wiederholenden Ereignissen aus Tiersicht und die daraus folgenden physiologischen Reaktionen sind bisher kaum geklärt. Diese Arbeit soll daher den Einfluss einer wiederholten Antizipation von positiven, negativen oder ambivalenten Reizen und die folglich induzierten Stimmungen auf die Immunkompetenz von Schweinen klären. Im Gegensatz zu bereits durchgeführten Studien der Aufruffütterung (Ernst et al., 2005, Zebunke et al., 2011, 2013) wird in dieser Arbeit die passive Antizipation getrennt von der Handlungskomponente untersucht. Somit soll geklärt werden, ob die bloße Antizipation eines Ereignisses ausreicht, das Wohlbefinden bei Tieren verbessern zu können. Bereits durchgeführte Studien geben Grund zur Annahme, dass die Immunkompetenz durch induzierte Stimmungen beeinflusst werden kann. So zeigten Ernst et al. (2006), dass die Anreicherung der Haltungsumwelt einen positiven Effekt auf die Wundheilung bei Schweinen hat. Bei Mäusen wurde eine Erhöhung der NK-Zellaktivität bei gleichzeitiger Minderung von ängstlichem Verhalten durch die Anreicherung der Haltungsumwelt nachgewiesen (Benaroya-Milshtein et al., 2004). Zudem ist

bekannt, dass die wiederholte Erfahrung von positiven oder negativen Reizen eine dauerhaft veränderte Stimmung induzieren kann (Dudink et al., 2006; Paul et al., 2005).

Diese Studie ist Teil eines größeren Kooperationsprojektes. So sollen innerhalb dieser Arbeit neuroendokrine Messparameter die negativen und positiven psychischen Zustände identifizieren, während ergänzend zu diesen Parametern die Herzaktivität (Herzfrequenz und Herzfrequenzvariabilität) und das Verhalten der Tiere von Frau Steffi Mahnhardt innerhalb ihrer Dissertation (2015) aufgenommen wurden. Des Weiteren soll in dieser Arbeit über die Erfassung von immunologischen Parametern die Immunkompetenz der Tiere charakterisiert werden. Mit Hilfe dieser Parameter sollen die in ihrer Valenz differierenden induzierten Stimmungen in ihrer immunmodulatorischen Wirkung bewertet werden. Daraus folgend soll die Eignung der wiederholten Reize als wohlbefindenssteigernde Maßnahmen für die Haltungsbedingungen in der landwirtschaftlichen Praxis geprüft werden. Diese Arbeit basiert dabei auf der Annahme folgender Hypothesen:

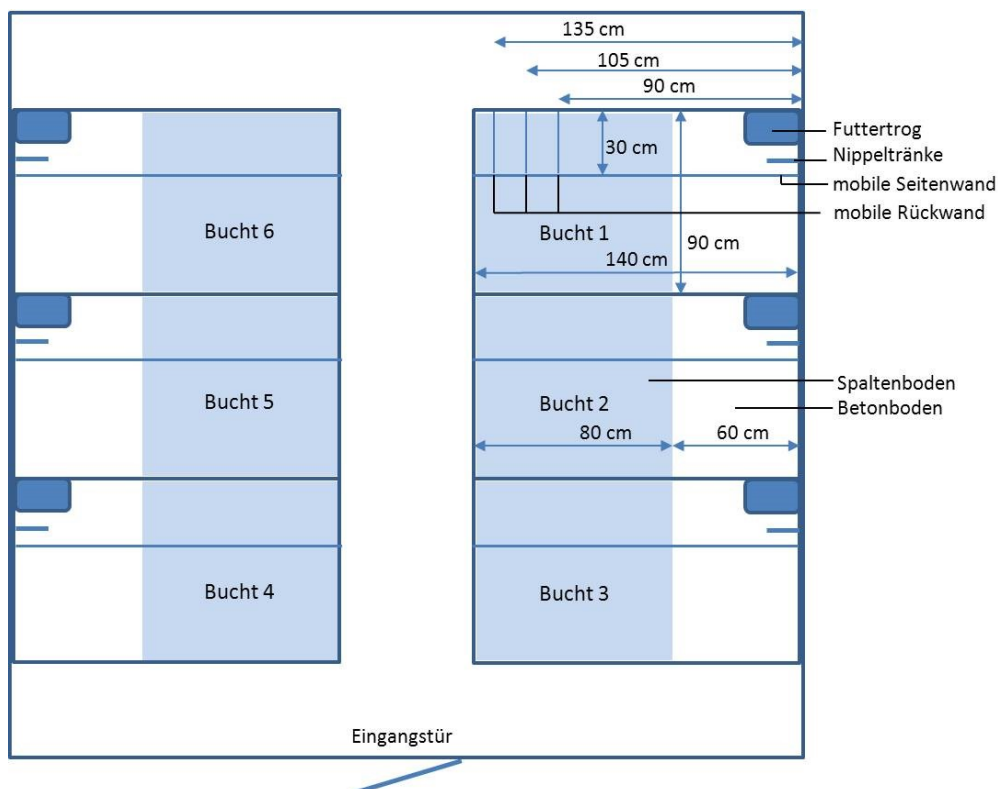
1. Reize, die wiederholt antizipiert werden, führen zu einer langanhaltenden Stimmungsänderung.
2. Stimmungsänderungen in Abhängigkeit von ihrer positiven oder negativen Qualität haben unterschiedliche Auswirkungen auf das Immunsystem von Schweinen. Während positive Stimmungen die Immunkompetenz steigern, führen negative Stimmungen zu einer Verminderung der Immunkompetenz.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Tiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere dienten in 17 Durchgängen 97 weibliche und fünf kastrierte Ferkel (*Sus scrofa domestica*) der Deutschen Landrasse aus der Zucht der Experimentalanlage Schwein (EAS) des Leibniz-Instituts für Nutztierbiologie (FBN). Jeder Durchgang lief 31 Tage. Pro Durchgang wurden, wenn möglich, sechs weibliche Ferkel ausgewählt. Im Falle nicht ausreichender weiblicher Tierzahlen pro Wurf wurden ersatzweise männliche Kastraten gewählt. Die ausgewählten Tiere waren stets Vollgeschwister und zeigten ähnliche Gewichte (7,7 - 14,74 kg). Die Ferkel wurden nach 4-wöchiger Säugetzeit abgesetzt und, um den Absatzstress zu minimieren, wurfweise gruppiert. Wasser und Futter (Ferkelstarter Plus, Trede und von Pein, Itzehoe, Deutschland) standen *ad libitum* zur Verfügung.

Mit Erreichen der 5. Lebenswoche (LW) wurden die sechs Tiere in einen gesonderten Versuchsstall (4,00 x 3,40 m) mit sechs Einzelbuchten (0,9 x 1,40 m) ins Tiertechnikum des FBN Dummerstorf (Abb. 2.1) transportiert.



**Abb. 2.1 Aufriss Versuchsstall im Tiertechnikum.** Im Versuchsstall im Tiertechnikum konnten die Tiere in sechs Einzelbuchten (90 x 140 cm) gehalten werden. Alle Buchten waren mit einem Futtertrog und einer Nippeltränke ausgestattet. Durch eine bewegliche Seiten- und Rückwand konnten die Einzelbuchten auf minimal 30 x 90 cm verkleinert werden.

Dort konnten der Tag-Nacht-Rhythmus, die Lufttemperatur und die relative Luftfeuchte kontrolliert werden. Der Versuchsraum wurde während der 5. LW auf  $24\pm 1$  °C und ab der 6. LW auf  $22\pm 2$  °C temperiert. Die relative Luftfeuchte betrug 50 % und die Beleuchtung erfolgte zwischen 6:00-18:00 Uhr.

Das Wasser stand den Tieren per Nippeltränke *ad libitum* zur Verfügung. Die Futtermittelvergabe (Ferkelstarter Plus, Trede und von Pein, Itzehoe, Deutschland) erfolgte über Futterautomaten (RAFÜ II / V 01-Dosierer, Mannebeck Landtechnik GmbH Schüttrorf, Deutschland) entsprechend den Empfehlungen für die kommerzielle Schweinehaltung. In jeder Einzelbucht befand sich ein Futterautomat, der zu Versuchsbeginn (5. LW) 0,48 kg Futter pro Tag und Tier und zum Versuchsende (10. LW) 0,96 kg pro Tag und Tier ausgab. Die Futtermenge wurde jeweils zum Beginn einer neuen Versuchswoche erhöht. Zusätzlich bekamen alle Tiere 0,1 kg Futter während der Einstellungsprozedur, sodass die Tiere ruhig blieben und die empfohlene Tagesration erreicht wurde (Lindermayer et al., 1994).

Die Tiere wurden in jeweils einzelne Versuchsbuchten (1,40 x 0,90 m) eingestallt. Die Buchtenbelegung erfolgte randomisiert, um buchtenabhängige Effekte auszuschließen. Zur Beschäftigung der Tiere außerhalb der Versuchszeit und während der Mittagszeit hing ein Pendelbalken in den einzelnen Buchten. Über jeder Bucht wurde eine Kamera (C4S-400; Panasonic Europe GmbH Wiesbaden, Deutschland) installiert. Die Tiere hatten olfaktorischen, akustischen und eingeschränkten visuellen und taktilen Kontakt zueinander. Durch eine bewegliche Seiten- und Rückwand konnten die Einzelbuchten auf minimal 0,3 x 0,9 m verkleinert werden, sodass die Tiere in ihrer Bewegung eingeschränkt waren. Die Restriktion war versuchsbedingt notwendig (genaue Applikation des Luftstoßes), wurde aber aus Tierschutzgründen nur während des Versuchs (7:30-15:15 Uhr, Montag bis Freitag und Sonntag) vorgenommen. Die Größe der Restriktionsfläche wurde durch die Größe der Tiere vorgegeben.

Alle durchgeführten Tierversuche wurden durch die Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt (AZ LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-056/09) und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert (MA 943/13-1).

## 2.2 Experimentelles Design

---

Bevor jeder Durchgang begann, wurden bereits erste Proben (Speichel, Blut) gesammelt (Abb.2.2). Mit dem Umzug der Schweine ins Tiertechnikum an Tag 0 startete der Durchgang und endete jeweils nach 31 Tagen. Innerhalb der *Handling*-Phase (Tag 0-6) erfolgte die Habituation der Tiere an die experimentelle Prozedur (Restriktion, Herzfrequenzgurte anlegen und tragen, Fütterung durch Futterautomaten) und den Versuchsstall im Tiertechnikum. Die Tiere wurden nun in Einzelbuchten gehalten und es wurden erneut Speichelproben genommen.

Die Konditionierung der Tiere startete an Tag 7. Über einen im Versuchsraum installierten Lautsprecher wurde ein Ton abgespielt, der für alle Tiere hörbar war. Der Ton wurde zufällig dreimal zwischen 7:30 Uhr und 10:30 Uhr und dreimal zwischen 12:00 Uhr und 15:00 Uhr abgespielt. Die Zeiten für den akustischen Reiz wurden automatisch durch einen Kontrollcomputer generiert, der ebenfalls die Futterausgabe steuerte. Das Einsetzen des akustischen Signals wurde durch eine Software überwacht, sodass stets mindestens 20 min zwischen den einzelnen Intervallen lagen. Der amplituden-modulierte Sinuston mit einer Frequenz von 800–1300 Hz, einer Amplitude von +3 dB und einer Frequenzmodulation von 0,25 Hz dauerte 1 min. Die Lautstärke betrug 82 dB. Drei der sechs Tiere wurden auf denselben Ton konditioniert. Es wurde eine klassische Konditionierung durchgeführt, bei der sich nach Ablauf des 1-minütigen Tonsignals (konditionierter Reiz) der unkonditionierte Reiz mit einer maximalen Verzögerung von 1 s anschloss. Als unkonditionierte Reize wurden Futter (positiv) oder ein Luftstoß mit 7,5 bar für 2 s (aversiv) verwendet. Die verbleibenden drei Tiere pro Durchgang erhielten tonunabhängige Reize.

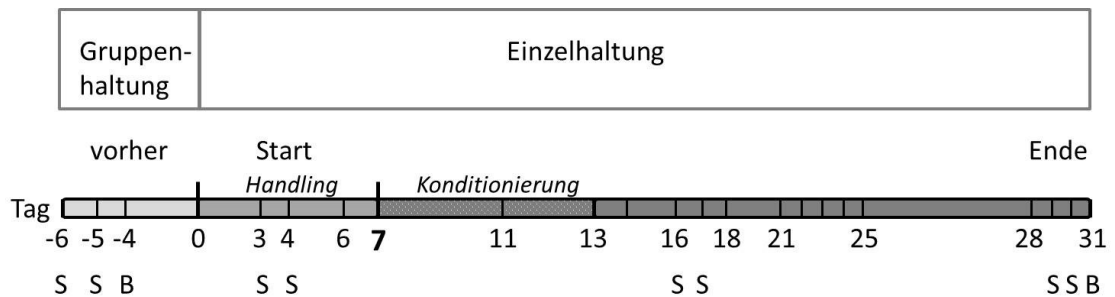
Alle sechs Tiere erhielten folgende unterschiedlichen Behandlungen:

- 1) Fütterung 6mal täglich 1/6 der Futterration zu zufälligen Zeiten nach dem akustischen Signal. Das Futter wurde mit 1 s Verzögerung nach Tonende durch den Futterautomaten ausgegeben. **Angekündigte Fütterung - AF**
- 2) Luftstoß 6mal täglich zufällig 1 min nach akustischem Signal. Die Futtervergabe ( $3 \times 1/3$  der Futterration) erfolgte zu den festen Zeiten 6:00 Uhr, 11:30 Uhr und 15:30 Uhr. **Angekündigter Luftstoß - AL**
- 3) Zufällig jeweils 3mal Futter ( $3 \times 1/3$  der Futterration) oder Luftstoß 1 min nach dem akustischen Signal. **Angekündigter Konflikt - AK**

- 4) Fütterung zufällig 6mal täglich 1/6 der Futtermenge ohne Bezug zum akustischen Signal. **Zufällige Fütterung - ZF**
- 5) Luftstoß zufällig 6mal täglich ohne Bezug zum akustischen Signal. Die Futtermenge (3 × 1/3 Futtermenge) erfolgte zu den festen Zeiten 6:00 Uhr, 11:30 Uhr und 15:30 Uhr. **Zufälliger Luftstoß - ZL**
- 6) Fütterung der halben Tagesration zu zwei festen Zeiten (6:00 Uhr, 15:00 Uhr). Futter stand nicht im Bezug zum akustischen Signal. **Feste Fütterung - FF**

Alle Tiere erhielten die gleiche Futtermenge pro Tag, jedoch in unterschiedlicher Zuordnung zum konditionierten Reiz und in verschiedenen Portionierungen. Das Tier in der Behandlungsgruppe Feste Fütterung wurde als Kontrolltier definiert.

Die Konditionierung fand an Tag 13 ihren Abschluss und die Behandlungen konnten gezielt während des Experiments eingesetzt werden. Es erfolgten weitere Entnahmen von Speichel an Tag 16, 17, 29 und 30. Jeder Durchgang endete an Tag 31 mit der Gewichtsbestimmung, weiteren Probennahmen (Blut und Gewebe) und dem Töten der Tiere.



**Abb. 2.2 Experimenteller und zeitlicher Ablauf.** Das Experiment startete an Tag 0, nachdem alle Tiere aus der Gruppen- in die Einzelhaltung überführt wurden und das Handling und die experimentelle Prozedur begann. Die Konditionierung auf ein für alle Tiere hörbares akustisches Signal startete an Tag 7 für die Behandlungsgruppen angekündigte Fütterung (AF), angekündigter Luftstoß (AL) und angekündigter Konflikt (AK). Als unkonditionierte Reize wurden Futter oder Luftstoß verwendet. Die Probennahme von Speichel (S) und Blut (B) erfolgte an den gekennzeichneten Tagen. Die Gewebeentnahme erfolgte am Ende des Experiments nach dem Töten der Tiere.

### 2.3 Entnahme von Blut, Gewebe und Speichel

---

Die Blutentnahmen erfolgten bei den Schweinen zum Beginn (Tag -4) und zum Ende (Tag 31) des Versuches durch Punktion der *Vena cava cranialis*. Die Tiere wurden hierfür in Rückenlage fixiert. Das Blut wurde in eisgekühlte Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) -Röhrchen überführt und für 10 min bei 2000 × g und 4 °C zentrifugiert. Das extrahierte Blutplasma wurde bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Für die statistische Auswertung wurde der Zeitpunkt der Blutentnahme zu Beginn des Versuchs als **Start** und zum Ende des Versuchs als **Ende** bezeichnet. Dies gilt auch für alle aus dem Blut und -plasma erhaltenen Analyseparameter (Differentialblutbild, Zytokine, Immunglobuline, Lymphozytenproliferation, NK-Zellen, ACTH, Plasmacortisol).

Die Speichelproben wurden an den Versuchstagen -6, -5, 3, 4, 16, 17, 29 und 30 um 10:30 Uhr gesammelt. Die Schweine kauten hierfür auf Wattestäbchen, bis diese gut mit Speichel durchnässt waren. Anschließend wurden die Stäbchen bei 3000 × g für 15 min und bei 4 °C zentrifugiert. Die Speichelproben wurden bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert. Für die statistische Auswertung und Darstellung wurden die jeweils aufeinander folgenden Tage gemittelt, zu einem Versuchsabschnitt zusammengefasst und nach folgender Legende bezeichnet:

Tag <b>-6</b> und <b>-5</b>	=	<b>v</b> (vor Experiment (Basiswerte))
Tag <b>3</b> und <b>4</b>	=	<b>h</b> (Handlingphase)
Tag <b>16</b> und <b>17</b>	=	<b>w</b> (während Experiment)
Tag <b>29</b> und <b>30</b>	=	<b>e</b> (Ende)

Bevor die Gewebeproben am Ende des Versuches entnommen werden konnten, wurden die Tiere durch eine intravenöse Injektion mit T61 getötet. Dabei handelt es sich um ein Kombinationspräparat mit 200 mg Embutramid, 50 mg Mebezonium und 5 mg Tetracain je ml. Das Gehirn wurde zügig entnommen und auf Eis gekühlt. Es wurden der Hypothalamus, der Hippocampus und die Amygdala freigelegt, gewogen, in Flüssigstickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert. Außerdem wurden die Nebennieren entnommen, ebenfalls gewogen und in Flüssigstickstoff eingefroren. Die gesamte Probennahme fand zwischen 8:00 Uhr und 11:00 Uhr statt.

## 2.4 Chemikalien

---

**Tab. 2.1 Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien.**

Chemikalien und Reagenzien	Firma
Agarose	Carl Roth GmbH
Calciumcarbonat (CaCO <sub>3</sub> )	Fisher Scientific GmbH
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Fisher Scientific GmbH
Canadabalsam	Chroma-Gesellschaft
Concanavalin A (ConA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Diethylpyrocarbonat	Carl Roth GmbH
Dihydroxybenzylamin (DHAB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DIOC18 (3,3'-Diocadecyloxacarbocyaninperchlorat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH
Dinatriumphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Eosin	Chroma-Gesellschaft
Essigsäure	Riedel-de Haen Honeywell Specialty Chemicals
Ethanol	Carl Roth GmbH
Ethylendiamin-Tetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH
Ficoll400	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Formaldehyd	Carl Roth GmbH
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom AG
Gentamycin	Biochrom AG
Giemsa-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Haematoxilin	Carl Roth GmbH
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Heptadecafluor-1-octansulfonsäure (Octansulfonsäure)	VWR International GmbH
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Lipopolysaccharid aus <i>E. coli</i> (LPS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
May-Grünwald-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH
Methanol	Carl Roth GmbH
MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure)	Carl Roth GmbH

Chemikalien und Reagenzien	Firma
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumacetat	Carl Roth GmbH
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH
Natriumdiatrizoat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumdodecylsulfat (engl. Sodiumdodecylsulfat; SDS)	Carl Roth GmbH
Perchlorsäure	Carl Roth GmbH
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
RPMI-1640	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Schwefelsäure	AppliChem GmbH
Staphylokokken-Enterotoxin-B (SEB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tetramethylbenzidine-Enzymsubstrat (TMB)	BioLegend
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Xylol	Merck KGaA

## 2.5 Zellisolation und- kultur

### 2.5.1 Vollbluttest

Für den Vollbluttest wurden 200 µl heparinisiertes Blut in 48-Well-Platten mit 550 µl RPMI-Kulturmedium für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Begasung im Inkubator kultiviert. Dem unstimulierten Ansatz (Kontrolle) wurden 250 µl RPMI und dem stimulierten Ansatz 50 µg/ml LPS (Gesamtmenge 250 µl) hinzugefügt. Nach Ablauf der 24 h wurden die Ansätze bei 120 × g für 10 min zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde bei -80 °C gelagert und für die Bestimmung der Zytokine TNF-α und IL-10 sowie des Eiweißgehalts verwendet. Als Bezugsgröße wurden die Leukozyten gezählt.

### 2.5.2 Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs)

Die PBMCs wurden mittels einer Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Hierfür wurden 2 ml Ficoll-Diatrizoat-Gradient II auf 2 ml Gradient I (Zusammensetzung s. Tab. 2.2) geschichtet. Anschließend wurden 3 ml heparinisiertes Schweinevollblut und 3 ml RPMI-1640-Medium (10 % FKS, 2 mM Glutamin, 0,05 mM 2-Mercaptoethanol und 50 µg/ml Gentamycin) gemischt und über die Ficoll-Diatrizoat-Gradienten I und II gegeben. Nach einer Zentrifugation (700 × g, 4 °C, 15 min) konnte die Plasmaschicht abpipettiert und die in der Schicht darunter liegenden PBMCs aufgenommen, in ein neues Röhrchen mit 7 ml RPMI-Medium überführt und erneut bei 160 × g und 4 °C für 10 min zentrifugiert werden. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet für 15 s mit 1 ml Aqua dest. gemischt, um noch vorhandene Erythrozyten zu lysieren. Die Zellyse wurde mit 108 µl NaCl-Lösung (8,8 %) gestoppt. Nach erneuter Zentrifugation bei 100 × g und 4 °C für 5 min wurde der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde nach zwei Waschschritten mit RPMI-Medium (160 × g, 4 °C, 10 min) in 1 ml RPMI-Medium (mit 10 % FKS, 2 mM Glutamin, 0,05 mM 2-Mercaptoethanol und 50 µg/ml Gentamycin) aufgenommen und in eine Zellkulturflasche mit 9 ml angereichertem RPMI-Medium überführt. Nach einer Kultur (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 18 h) konnten die Zellen für weitere Tests verwendet werden. Die Vitalität der Zellen wurde mit einer Trypanblau-Färbung überprüft. Die konduktometrische Zellzählung erfolgte mit dem *Cell-Counter Multisizer 2* (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland).

**Tab. 2.2 Zusammensetzung der Ficoll-Diatrizoat-Gradienten I und II.**

Gradient I (100 ml)	Gradient II (100 ml)
11,00 g Natriumdiatrizoat	9,00 g Natriumdiatrizoat
2,85 g Ficoll 400	2,85 g Ficoll 400
0,5 mM EDTA	0,5 mM EDTA
5,0 mM HEPES	5,0 mM HEPES

### 2.5.3 Myeloische Blutzelllinie K562

---

Die humane Leukämie-Zelllinie K562 wurde nach Herstellerangaben in Kultur gebracht. Das verwendete Kulturmedium (RPMI 1640) wurde mit 10 % FKS, 2 mM Glutamin, 0,05 mM 2-Mercaptoethanol und 5 µg/ml Gentamycin angereichert. Die K562-Zellen wurden im NK-Zell-Assay verwendet.

## 2.6 Allgemeiner Gesundheitszustand

---

### 2.6.1 Körpergewicht

---

Das Gewicht der Schweine wurde bis zur 4. LW in der EAS bestimmt. Mit dem Umzug der Tiere in das Tiertechnikum und dem Beginn des Versuchs wurden die Schweine einmal wöchentlich gewogen, sodass mit dem Geburtsgewicht elf Messwerte aufgenommen wurden.

### 2.6.2 Eiweißgehalt

---

Im Plasma, in den Vollblutüberständen und in den Zellkulturüberständen wurden die Proteinkonzentrationen mittels der Biuret-Reaktion nach Weichselbaum (1946) bestimmt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm mit dem UV/VIS Spektralphotometer DU®640 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) gemessen.

### 2.6.3 Leukozytenzahl

---

Zur Bewertung des allgemeinen Gesundheitszustandes der Tiere wurden die Leukozyten gezählt. Die Leukozytenzahl kann infektionsbedingt stark vom Referenzbereich abweichen, das heißt erhöht oder vermindert sein.

Für die Zählung der Leukozyten wurde heparinisertes Blut in einer Leukozytenmischpipette 1:10 mit 3 % Essigsäure verdünnt und 15 s gemischt, sodass die Erythrozyten lysiert wurden. Mittels einer Neubauer-Zählkammer erfolgte die Auszählung der Leukozyten. Hierfür wurde

das Blut aus der Pipette in die Zählkammer eingebracht und 4 große Zählquadrate ausgezählt. Zur Berechnung der Zellzahl wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{Leukozyten}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Leukozyten}}{\text{Quadrate} \times \text{Kammerfläche} \times \text{Kammerhöhe} \times \text{Verdünnung}} \times 1000$$

(Quadrate (Zählquadrate): 4; Kammerfläche: 1 mm<sup>2</sup>, Kammerhöhe: 0,1 mm, Verdünnung: 1:10)

#### 2.6.4 Tiergesundheit

---

Alle Tiere wurden im Verlauf des Versuchs hinsichtlich ihrer Gesundheit genau beobachtet und wenn nötig medikamentös behandelt. Aufgetretene Krankheiten wurden dokumentiert. Tiere mit Durchfallerkrankungen (Diarrhö) wurden anfänglich mit Kohle (Carbophen C100) und bei Fortbestehen der Erkrankung intramuskulär mit dem Antibiotikum Trimethosel (1 ml) therapiert. Bei auftretender Obstipation wurde Rapsöl verabreicht. Allgemein erkrankte Tiere (erhöhte Körpertemperatur, ungewöhnlich ruhige Tiere) wurden mit Metapyrin und Trimetosel (Antibiotika) behandelt. Fortwährende (länger als eine Woche) Inappetenz wurde mit dem Antibiotikum Dextat therapiert. Bei Entzündungen der Augen wurden diese mit physiologischer NaCl-Lösung gespült. Auftretende Abszesse oder Ödeme an den Gliedmaßen wurden mit Kampfersalbe behandelt. Entzündungen im Genitalbereich wurden mit Lebertransalbe therapiert.

Antibiotische Therapien wurden stets von einem Tierarzt verordnet und durchgeführt.

## 2.7 Analytik

---

### 2.7.1 Physiologische Parameter der HPA-Achse

---

#### 2.7.1.1 ACTH

---

Im EDTA-Plasma wurden die ACTH-Konzentrationen mit einem ELISA-Kit für humanes ACTH (EIA-3647, DRG Instruments GmbH, Deutschland) nach Herstellerangaben quantifiziert. Der Test wurde für die ACTH-Quantifizierung im Schweineplasma validiert, wobei die Empfindlichkeit 3,3 pg/ml und die Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten 2,3 % bzw. 4,5 % betragen. Die Kreuzreaktivität wurde für die Fragmente (1-24) und (18-39) sowie für  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon und  $\beta$ -Endorphin mit weniger als 5,0 % angegeben.

#### 2.7.1.2 Cortisol

---

##### **Plasma**

Die Cortisolkonzentrationen wurden im EDTA-Plasma in Doppelbestimmung mittels eines kommerziellen ELISA-Kits (EIA-1887, DRG Instruments GmbH, Germany) nach Herstellerangaben bestimmt. Die Kreuzreaktivität der Cortisolantikörper wurde für verschiedene Steroide getestet und betrug 45 % für Corticosteron, 9 % für Progesteron, weniger als 2 % für Deoxycortisol und Dexamethason und für alle weiteren Steroide weniger als 0,01 %. Die Sensitivität der Cortisolbestimmung lag bei 2,5 ng/ml. Die Intra- und Inter-Assay-Varianzen betragen 3,2 % und 7,7 %.

##### **Speichel**

In 25  $\mu$ l Speichelproben wurde die Cortisolkonzentration in Doppelbestimmung mit einem kommerziellen ELISA Kit (SLV-4635, DRG Instruments GmbH, Germany) nach Herstellerangaben ermittelt. Die Kreuzreaktivität wurde mit 4,6 % für 11-Desoxycortisol, 1,25 % für Corticosteron, 0,69 % für 17- $\alpha$ -Hydroxyprogesteron, 0,192 % für Desoxycorticosteron, 0,035 % für Progesteron und mit weniger als 0,001 % für alle weiteren getesteten Steroide angegeben. Die Sensitivität betrug 0,012 ng/ml und die Intra- und Inter-Assay-Varianzen lagen bei 2,62 % und 4,94 %.

### 2.7.1.3 Genexpression von CRH und GR

---

#### **RNA-Extraktion**

Die Gewebeproben vom Hypothalamus, Hippocampus und von der Amygdala wurden mittels Flüssigstickstoff und manuellem Mörser pulverisiert. Anschließend erfolgte die Extraktion der RNA aus den Gewebeproben nach Herstellerangaben mit dem *RNeasy Lipid Tissue Kit* in Kombination mit dem *RNase-Free DNase Set* (Qiagen, Deutschland). Die Proben (max. 100 mg) wurden mit 1 ml Lysispuffer versetzt und mit dem Dispergiergerät *Ultra Turrax T18 basic* (IKA, Deutschland) homogenisiert (90 s, 233 Hz) und entsprechend der Herstellerangaben weiter verarbeitet. Die RNA wurde dann mit 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert, die Konzentration und die Reinheit wurden mittels Nanophotometer (Implen GmbH, München, Deutschland) bei 260/ 280 nm ermittelt. Die RNA-Proben wurden zusätzlich auf ihre Integrität per Elektrophorese überprüft. Hierfür wurde ein 1,5 %-iges Agarosegel in 20 ml pH-neutralem MOPS-Puffer (4 M 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS), 1,66 M Natriumacetat, 0,13 M EDTA, 10 % Diethylpyrocarbonat) verwendet. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

#### **RT-PCR**

Für die Umschreibung der extrahierten RNA in cDNA wurde der *iScript cDNA Synthese Kit* (Bio-Rad, Deutschland) verwendet. Die RNA-Konzentration wurde auf 500 ng eingestellt. Der eisgekühlte Reaktionsansatz enthielt 4 µl Reaktionsmix und 1 µl einer Reversen Transkriptase aus dem *Moloney murine leukemia virus* und wurde mit RNase-freiem Wasser nach Herstellerangaben aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte im Thermocycler Primus 96 plus (MWG Biotech, Deutschland) nach folgendem Ablauf: 5 min bei 25 °C, 30 min bei 42 °C und 5 min bei 85 °C. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C zwischengelagert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase.

#### **Real-Time qPCR**

Die Genexpression wurde mit Hilfe der quantitativen *Real-Time* PCR (qPCR) untersucht. Dabei wurde die Genexpression von porcinem GR und CRH auf die nicht regulierten, endogenen Referenzgene ACTB ( $\beta$ -Actin) und TBP (*TATA box binding protein*) normiert. Die Primer für die Analyse der Zielgene wurden mit dem Programm „Primer 3“ erstellt (Rozen und Skaletzky, 1998) und von der Firma TIB Molbiol (Berlin, Deutschland) synthetisiert. Für die mRNA-Expressionen von GR und CRH sind die Nukleotidsequenzen der Primer, die Längen und spezifischen Schmelztemperaturen der entstandenen Produkte sowie die Zugangsnummern (Datenbank des *National Center for Biotechnology Information*) der genutzten Nukleotidsequenzen in Tab. 2.3 angegeben.

Tab. 2.3 Charakterisierung der verwendeten Primer in der qPCR.

Gen	Forward Primer 5' → 3' Reverse Primer 5' → 3'	Produktlänge [bp]	Spezif. Schmelztemp. [°C]	Zugangsnummer
CRH	CTCAGAGCCCAAGTCCGTTGAGAGA GCATTTTAGGGGCGCTAGCTTCTGA	178	76,6	NM_001113062
GR	GTTCCAGAGAACCCCAAGAGTTCA TCAAAGGTGCTTTGGTCTGTGGTA	173	78	AY779185

Die *Real-time* qPCR wurde in einem CFX96 *Touch*<sup>TM</sup> *Real-Time* PCR Detection System (Bio-Rad, Deutschland) unter Verwendung des *iQ SYBR Green Supermix* (Bio-Rad, Deutschland) durchgeführt. Jeder 10 µl-Reaktionsansatz bestand aus 5 µl *Supermix*, 4 µl des jeweiligen Primerpaares und 1 µl Probe bzw. interner Kontrollen aus der RT-PCR bzw. RNase-freies Wasser als Negativkontrolle. Die Proben wurden in Dreifachbestimmung auf eine 96-Well-PCR-Platte pipettiert, mit einer adhäsiven Folie verschlossen und in das qPCR-Gerät überführt. Nach einem initialen Polymerase-Aktivierungsschritt von 3 min bei 95 °C folgte die Denaturierung der DNA in 39 Zyklen mit folgendem Schema: 10 s bei 95 °C, 30 s bei 60 °C, 45 s bei 70 °C. Die PCR wurde mit einem Abschlusszyklus (10 s bei 95 °C, 10 s bei 60 °C und 60 min bei 95 °C) beendet. Die Spezifität der qPCR-Produkte wurde über eine Schmelzpunktanalyse (60 °C bis 90 °C, 1 °C per 10 s) sowie eine Agarose-Gelelektrophorese (2 %, *Cyber Gold*) überprüft. Die relative Quantifizierung erfolgte mit der zum Gerät zugehörigen Software (CFX Manager<sup>TM</sup>, Bio-Rad, Deutschland) auf der Grundlage der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

#### 2.7.1.4 Nebennieren

Für die histologische Analyse der Nebennieren wurden von der linken und rechten Nebenniere 7 µm-feine Gewebeschnitte quer zur Längsachse mit einem Kryomikrotom (CM 30505, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Germany) angefertigt. Die Präparate wurden zuvor mit Wasser auf dem Objektträger bei -21 °C fixiert. Die Gewebeschnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt, sodass Cortex und Medulla der Nebennieren differenziert werden konnten. Hierfür wurden die Präparate für 5 min in Formol-Calcium (4 % Formaldehyd, 0,09 M CaCl<sub>2</sub>, 0,12 M Ca<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) fixiert und anschließend zweimal mit Aqua dest. gespült. Danach folgte die

Färbung mit dem sauren Farbstoff Hämatoxylin nach Harris für 3-10 min. Um den pH-Wert nach der sauren Färbung wieder zu erhöhen, wurden die Schnitte 10 min unter laufendem Leitungswasser gespült und darauf folgend zweimalig mit Aqua dest. gewaschen. Um das Zytoplasma anzufärben, wurden die Schnitte für 5 min in 0,1 % Eosin-Kalium inkubiert und anschließend mit Aqua dest gespült. Noch enthaltene Wasserreste wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 70 %, 96 %, 100 %) entfernt, anschließend wurde der Schnitt zweimal für je 5 min in Xylol geklärt. Die Präparate wurden abschließend mit Canadabalsam eingedeckelt. Drei ausgewählte Schnitte wurden mit Hilfe einer Videokamera (CF15/2RGB; KAPPA, Gleichen, Deutschland) und einem Computersystem (SIS; Münster, Deutschland) aufgenommen. Die umgebende Bindegewebskapsel, die Grenze zwischen Cortex und Medulla sowie Aussparungen durch vorhandene Blutgefäße wurden nachgezeichnet. Mittels des Bildanalysenprogramms SIS wurden die markierten Bereiche für die Ermittlung der Gesamtfläche der Nebenniere, des Cortex und der Medulla (ausgenommen die Aussparungen) genutzt. Für jeden ausgewählten Gewebsschnitt wurden die markierten Zellen ausgezählt und ins Verhältnis zur ermittelten Fläche gesetzt (Zellzahl/mm<sup>2</sup>), sodass die Zelldichte angegeben werden konnte.

### 2.7.2 Neurotransmitter

---

Die Quantifizierung der Neurotransmitter NA, 5-HT und dessen Metabolit 5-HIAA, DA und dessen Metaboliten 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure (DOPAC) und Homovanillinsäure (HVA) erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit elektrochemischer Detektion. Die Neurotransmitter wurden im VTA, im PFC und im NAc detektiert. Die Gewebe wurden gewogen, 10 ng Dihydroxybenzylamin (DHAB) als Standard hinzu gegeben und für 5 min mit 0,2 M Perchlorsäure (1,5 ml) und einem Handhomogenisator auf Eis homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 45000 × g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und bis zur weiteren Verwendung kühl gestellt. Das erhaltene Homogenat wurde erneut mit 0,5 M Perchlorsäure versetzt, mit einem Glasstab homogenisiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 45000 g, 4 °C). Die gewonnenen Überstände wurden gemischt und wieder zentrifugiert (10 min, 50000 g, 4 °C). Direkt nach der Extraktion wurden jeweils 20 µl der Aliquots ins HPLC-System (SIL-10A, Shimadzu Europa, Duisburg, Deutschland) injiziert. Die Extrakte wurden in Duplikaten untersucht und überzählige Reste wurden bei -80 °C gelagert. Die Auftrennung der Proben erfolgte durch eine

Umkehrphasensäule (reverse Phasen, RP; 125 x 4 mm), die mit Prontosil C18 AQ (Bischoff Analysetechnik, Leonberg, Germany) beladen war. Die mobile Phase bestand aus 58 mM Natriumhydrogenphosphatpuffer (pH 3,5) mit 1,2 mM Octansulfonsäure, 0,3 mM EDTA, 2 mM KCl und 9 % Methanol. Die Fließrate betrug 1,2 ml/min. Die elektrochemische Detektion erfolgte mit dem DECADE II und der enthaltenen ISAAC-Zelle mit einer Arbeitselektrode aus Glascarbon (Antec Leyden, Zoeterwoude, Niederlande) bei einem Potential von 600 mV. Die untersuchten Neurotransmitter konnten innerhalb einer Retentionszeit von 37 min eluiert werden. Die Identifizierung der Peaks erfolgte über die Zugabe von Referenzsubstanzen zu den Proben. Die Homogenität der Peaks wurde durch eine variable Zusammensetzung der mobilen Phase und verschiedene Potentiale der Arbeitselektrode erreicht. Die Kurven der Einzelpunktkalibrierung wurden unter der Verwendung der Peak-Flächen im Vergleich zur Konzentration des Analyten kalkuliert. Für jede Substanz wurde ein Reaktionsfaktor im Verhältnis zum DHAB bestimmt. Die Intra-Assay-Varianz lag für die verschiedenen Neurotransmitter zwischen 2,4 und 5,3 % und die Inter-Assay-Varianz zwischen 2,8 und 7,0 %. Die jeweiligen Konzentrationen der Neurotransmitter in den verschiedenen Geweben wurden in pg je mg Gewebegewicht angegeben. Der Umsatz von DA konnte durch die Quotienten aus HVA und DA sowie aus DOPAC und DA bestimmt werden. Der Umsatz von 5-HT ergab sich aus dem Quotienten von 5-HIAA und 5-HT.

### 2.7.3 Physiologische Parameter des Immunsystems

#### 2.7.3.1 Lymphozytenproliferation

Die Bestimmung der Mitogen-induzierten Lymphozytenproliferation erfolgte mit dem Lymphozytentransformationstest (LTT), einem colorimetrischem Assay zur Proliferationsmessung und einem *in vitro*-Index für zelluläre Immunfunktionen. Zwei T-Zell-spezifische Mitogene, Concanavalin A (0,6 µg/ml, ConA) und Phytohämagglutinin (10,0 µg/ml, PHA) und ein B- und T-Zell-spezifisches Superantigen Staphylokokken-Enterotoxin-B (1,5 µg/ml, SEB) wurden für den LTT genutzt. Die verwendeten Konzentrationen der Mitogene ConA und PHA und des Superantigens SEB wurden über Dosis-Titrierversuche bestimmt. Die isolierten PBMCs (100 µl,  $2 \times 10^6$ /ml) wurden in einem Dreifachansatz in eine 96-Well-Kulturplatte gegeben. Die Stimulation der PBMCs erfolgte mit dem jeweiligen Mitogen/Superantigen (100 µl). Die Zugabe von 100 µl RPMI-1640-Medium diente als Kontrolle für spontane Proliferation. Nach der Inkubation (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 72 h) wurde die

Platte bei  $220 \times g$  und Raumtemperatur (RT) für 10 min zentrifugiert und die Überstände vollständig abgenommen. Danach wurden  $10 \mu\text{l}$  3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT-Reagenz) in jedes Well gegeben und für weitere vier Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Der membrangängige gelbe Farbstoff MTT wurde von der mitochondrialen Dehydrogenase in lebenden Zellen metabolisiert und zu blauen Formazan-Kristallen reduziert. Die entstandenen Formazan-Kristalle wurden mit  $100 \mu\text{l}$  erwärmter 10 %-iger SDS-Lösung bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  über Nacht, nach erfolgter Zelllysis, in das Medium freigesetzt. Die optische Dichte (O.D.) wurde bei einer Wellenlänge von 550 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm mittels Mikrotiterplattenreader (Dynatech MR5000, Dynex, Denkendorf, Deutschland) gemessen. Aus dem Quotienten der O.D. von stimulierten Zellen und nicht stimulierten Zellen konnte der Proliferationsindex berechnet werden.

### 2.7.3.2 Immunglobuline

---

Die Quantifizierung der Immunglobuline A, G und M im Plasma erfolgte mit einem *Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay* (ELISA). Der quantitative Sandwich-ELISA wurde in Doppelbestimmung mit kommerziellen schweinespezifischen ELISA-Test-Kits (E100-102, E100-104, E100-100, Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, Texas, USA) durchgeführt. Die 96-Wellplatten wurden jeweils mit Anti-Schwein-IgA, -IgG oder -IgM-Antikörper aus der Ziege beschichtet. Die Plasmaproben wurden jeweils 1:10000 (IgA, IgM) und 1:50000 (IgG) verdünnt. Als Detektionsantikörper in Kombination mit dem Tetramethylbenzidin-Enzymsubstrat (TMB) wurde der mit der Meerrettichperoxidase-gekoppelte Anti-Schwein-IgA, -IgG oder -IgM-Antikörper aus der Ziege verwendet. Die Enzym-Substrat-Reaktion wurde durch 0,18 M Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) gestoppt. Die Absorption wurde bei 450 nm mit dem Mikrotiterplattenreader Dynatech MR5000 (DYNATECH Laboratories, USA) gemessen. Die Probenquantifizierung erfolgte relativ zur Standardkurve, die mittels bekannter Mengen von IgA, IgG und IgM kalkuliert wurde. Die Testsensitivität lag jeweils bei 15,625 ng/ml IgA, 7,8 ng/ml IgG und 15,625 ng/ml IgM.

### 2.7.3.3 Zytokine

Mit Hilfe kommerzieller ELISAs wurde überprüft, ob die Behandlung der Tiere die Fähigkeit ihrer PBMCs, nach Mitogenstimulation Zytokine zu produzieren, veränderte. Die PBMCs ( $4 \times 10^6$ /ml) wurden in einem 500  $\mu$ l RPMI-Mitogen-Mix (SEB: 1,5  $\mu$ g/ml, PHA: 10,0  $\mu$ g/ml oder ConA: 0,6  $\mu$ g/ml) in 48-Well-Platten in Kultur gegeben (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 72 h). Anschließend wurden die Platten zentrifugiert (220  $\times$  g, 10 min, RT) und die Zellkulturüberstände (2  $\times$  300  $\mu$ l) für die Analyse der Produktion der Zytokine IL-4, IL-10 und IFN- $\gamma$  verwendet. Die Überstände wurden bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert. Die Konzentrationen wurden von IL-4, IL-10 und IFN- $\gamma$  im Zellkulturüberstand in Doppelbestimmung mit den schweinespezifischen ELISA-Kits KSC0042 (IL-4), KSC0101 (IL-10) und KSC4021 (IFN- $\gamma$ ) von *Life Technologies* (USA) entsprechend der Herstellerangaben gemessen.

Für die Vollblutuntersuchungen wurden 200  $\mu$ l heparinisieretes Vollblut in 550  $\mu$ l RPMI-1640-Medium (mit 10 % FKS, 2 mM Glutamin, 0,05 mM 2-Mercaptoethanol und 50  $\mu$ g/ml Gentamycin angereichert) in einem Einfachansatz in 48-Wellplatten kultiviert. Dem unstimulierten Ansatz (Kontrolle) wurden 250  $\mu$ l RPMI und dem stimulierten Ansatz 50  $\mu$ g/ml LPS (Gesamtmenge 250  $\mu$ l) hinzugefügt. Die Zellen wurden in Kultur gegeben (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 24 h) und anschließend zentrifugiert (160  $\times$  g, RT, 10 min). Die Vollblutüberstände wurden bei -80 °C gelagert und für die Quantifizierung der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-10 genutzt. Die Konzentrationen von TNF- $\alpha$  und IL-10 im Vollblutüberstand wurden in Doppelbestimmung mit den schweinespezifischen ELISA-Kits KSC0101 (IL-10) und KSC3011 (TNF- $\alpha$ ) von *Life Technologies* (USA) entsprechend der Herstellerangaben gemessen.

Die Sensitivität sowie die Intra- und Inter-Assay-Varianz der verschiedenen Tests sind in Tab. 2.4 aufgeführt.

**Tab. 2.4 Sensitivität und Präzision der verwendeten ELISA-Tests.**

Zytokin	Sensitivität [pg/ml]	Intra-Assay-Varianz [%]	Inter-Assay-Varianz [%]
IL-4	$\geq 2$	3,7	4,9
IL-10	$\geq 3$	6,3	9,4
IFN- $\gamma$	$\geq 2$	4,9	8,8
TNF- $\alpha$	$\geq 3$	6,2	8,2

### 2.7.3.4 NK-Zell-Assay

---

#### **Effektor- und Zielzellen**

Zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen wurde ein Fluoreszenz-basierter, durchflusszytometrischer Assay nach Piriou et al. (2000) durchgeführt, bei dem PBMCs mit NK-Effektorzellen und die Krebszelllinie K562 als Zielzellen eingesetzt wurden. Die separierten PBMCs wurden in einer Kulturflasche für 18 h im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert (s. Kap. 2.5.2). Danach wurden die PBMCs in Zentrifugenröhrchen überführt, bei 160 × g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, in 1 ml RPMI-1640-Medium aufgenommen und auf eine Zelldichte von 2 × 10<sup>7</sup>/ml eingestellt. Zwei weitere 1:2-Verdünnungen (1 × 10<sup>7</sup>/ml, 5 × 10<sup>6</sup>/ml) wurden hergestellt und bis zum Gebrauch auf Eis gestellt. Die K562-Zellen (5 ml) wurden, wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben, vorkultiviert, in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 160 × g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die K562-Zellen in 3 ml RPMI-Medium aufgenommen.

#### **Zellfärbung**

Die Zielzellen (K562) wurden mit dem lipophilen, grün fluoreszierenden Zellmembranfarbstoff 3,3'-Diocetadecyloxycarbocyaninperchlorat (DIOC18) separat gefärbt, um eine Unterscheidung von den NK-Effektorzellen (PBMCs) zu ermöglichen. Es wurden 2 ml der K562-Zellsuspension mit 4 µl DIOC18 (30 mM; gelöst in 0,2 % DMSO) für 30 min im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) gefärbt. Während der Inkubation wurde die Zellsuspension zur Durchmischung leicht geschüttelt und danach zweimal mit HBS-Puffer (*HEPES Buffered Saline* (HBS), enthält 16 mM HEPES, 0,9 % NaCl) gewaschen, indem die K562-Zellen bei 220 × g und 4 °C für 5 min zentrifugiert wurden. Das Zellpellet wurde in 1 ml RPMI-Medium aufgenommen, die Zellkonzentration auf 5 × 10<sup>5</sup>/ml eingestellt und anschließend auf Eis gelagert.

Die Zellvitalität der PBMCs und der K562-Zellen wurde über eine DNA-Färbung mit einem rot fluoreszierenden Farbstoff (Propidiumjodid (PJ) 10 µg/ml) bestimmt. Dieser DNA-Farbstoff kann nur durch permeable Zellmembranen von toten Zellen diffundieren. Für die jeweilige Messung wurden 100 µl PBMCs in 550 µl HBS-Puffer sowie 50 µl K562-Zellen in 600 µl HBS aufgenommen und anschließend mit jeweils 10 µl PJ (0,65 mg/ml) versetzt. Der Anteil der toten Zellen wurde durchflusszytometrisch quantifiziert. Es wurden mindestens 2500 Zellen pro Probe erfasst.

### **Zytotoxizitätstest**

In 96-Wellplatten wurden 100 µl der auf Eis gestellten Verdünnungen der PBMC-Effektorzellen (E,  $2 \times 10^7$ /ml,  $1 \times 10^7$ /ml,  $5 \times 10^6$ /ml) mit 50 µl der K562-Zielzellsuspension (Z,  $5 \times 10^5$ /ml) gemischt, um 80:1, 40:1 und 20:1 Verdünnungen (E/Z) zu erhalten. Um einen besseren Zellkontakt zu gewährleisten, wurde die Platte bei  $100 \times g$  und  $4^\circ C$  für 30 min zentrifugiert. Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen konnte dann ermittelt werden, indem die Platte bei  $37^\circ C$  und 5 %  $CO_2$  für 4 h inkubiert wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben in Messröhrchen überführt. Hierfür wurden 150 µl E/Z-Zellmix in 500 µl HBS-Puffer aufgenommen und mit 10 µl PJ (10 µg/ml) gefärbt. Der Anteil der Zielzellen wurde durchflusszytometrisch quantifiziert.

### **Kontrollen**

Der spontane Zelltod wurde mittels der Niedrigkontrolle für den Zytotoxizitätstest bestimmt. Hierfür wurde eine zweite Platte mit Effektor- und Zielzellen, äquivalent zur Aktivitätsmessung beim Zytotoxizitätstest, mit einer Verzögerung von 30 min angesetzt. Diese Platte wurde bei  $4^\circ C$  für 4 h inkubiert, um die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen zu inhibieren.

In Vorversuchen wurde der maximale Anteil an toten Zellen ermittelt, indem das Zellgemisch (Ziel- und Effektorzellen) mit Saponin als Detergenz (20 µl, 0,23 mg/ml) im Inkubator ( $37^\circ C$ , 5 %  $CO_2$ , 4 h) behandelt wurde. Dieser Anteil an permeabilisierten Zellen wurde auf 100 % gesetzt.

Die Vitalität der Effektorzellen sowie der gefärbten bzw. ungefärbten Zielzellen wurde über die Färbung mit PJ (10 µg/ml) ohne Permeabilisierung der Zellen erhalten. Der Zytotoxizitätstest wurde nur durchgeführt, wenn die Zellvitalität über 80 % lag.

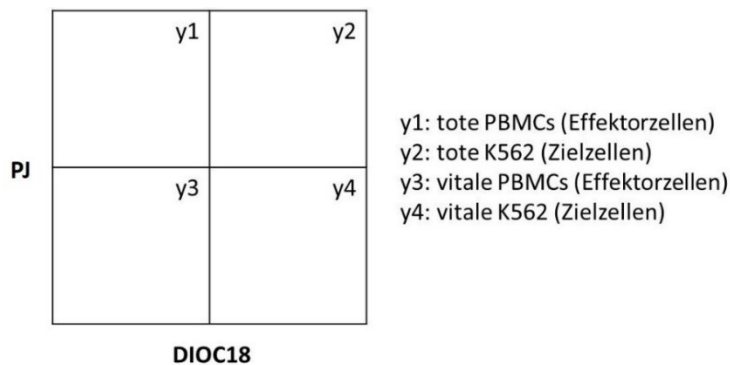
### **Durchflusszytometrische Quantifizierung von Effektor- und Zielzellen**

Die fluoreszenz-basierte Analyse der Zellen wurde mit dem Durchflusszytometer Gallios (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) durchgeführt, welches mit einem Argon-Laser (Excitation 488 nm, blau) und einer multiplen, optischen Bank für die Emission (grün, orange, rot, tiefrot) ausgerüstet ist. Für die Vitalitätsbestimmung wurden mindestens 2500 und für den Zytotoxizitätstest mindestens 10000 Zellen pro Probe erfasst. Die Zellen wurden einzeln hinsichtlich Zellgröße, Zellgranularität, grüner und roter Fluoreszenz analysiert und anschließend quantifiziert.

Die interessierenden Zellen wurden nach folgenden zwei Schritten identifiziert:

- (1) Erstellung eines Histogramms (Häufigkeitsverteilung der Messsignale eines Parameters), welches die Zellgröße und Zellgranularität erfasst
- (2) Festsetzen des Fluoreszenzhistogramms

Die Zellgröße konnte durch die Messung der Intensität des Vorwärtsstreulichts (*forward scatter*, FS) bestimmt werden. Die Zellgranularität wurde über die Intensität des Seitwärtsstreulichts (*side scatter*, SS) ermittelt. Für den Nachweis des Anteils toter (rote Fluoreszenz) und DIOC18 (grüne Fluoreszenz) positiver Zellen wurde eine Doppelfluoreszenzanalyse durchgeführt. Dann wurden beide Fluoreszenzintensitäten gegeneinander dargestellt und quantifiziert. Die Zellen konnten hinsichtlich Vitalität und Zelltyp differenziert werden (Abb. 2.3), nachdem, aufgrund der Doppelfärbung, die Sortierung der Zellsignale in vier verschiedenen Quadranten (y1, y2, y3, y4) erfolgte.



**Abb. 2.3 Histogramm für die durchflusszytometrische Zeldifferenzierung.** Die Differenzierung der mit PJ und DIOC18 gefärbten Zellen konnte durch die Sortierung der Zellsignale in die vier verschiedenen Quadranten (y1, y2, y3, y4) erfolgen. Die Zellen konnten hinsichtlich Vitalität und Zelltyp differenziert werden.

Für die weitere Analyse der Zytotoxizität wurden *Gates* (sogenannte Filter) für die Quadranten y2 und y4 gesetzt, um so das Augenmerk auf die für die Bestimmung der Zytoxizität interessierenden Zellen zu legen. Anschließend konnten die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Quantifizierung als Zytotoxizität in % angegeben werden, nachdem diese nach folgender Formel berechnet wurde:

$$\text{Zytotoxizität} = \left[ \frac{(\% \text{ lysierte Zielzellen im Test} - \% \text{ spontaner Zelltod})}{(\% \text{ maximale Lysis} - \% \text{ spontaner Zelltod})} \right] * 100$$

### 2.7.3.5 Differentialblutbild

Im Differentialblutbild wurden Leukozyten anhand ihrer Morphologie unterschieden (Tab. 2.5). Die Differenzierung konnte anhand der Zellform und -größe, Kernform, -größe und -struktur, Plasmafärbung, Granulierung und Kern-Plasma-Relation erfolgen (Niepage, 1989, Kixmüller, 2004). Die angefertigten Blutaussstriche wurden für 2 h getrocknet und nach Pappenheim angefärbt. Dazu wurden die Objektträger 2 min in einer May-Grünwald-Lösung inkubiert, danach mit Aqua dest. gespült und anschließend für 30 min mit einer Giemsa-Lösung (Verdünnung 1:20) gefärbt. Nachdem die Objektträger mit Aqua dest. gespült wurden, trockneten die Präparate an der Luft. Die Leukozytenverteilung wurde mikroskopisch durch Auszählung von 200 Leukozyten ermittelt.

**Tab. 2.5 Differenzierung von porcinen Blutzellen im Differentialblutbild.** Häufigkeit bezieht sich auf Referenzwerte von 10-12 Wochen alten Schweinen der Deutschen Landrasse (Kixmüller, 2004).

Differentialblutbild	Größe [ $\mu\text{m}$ ]	Häufigkeit [%]
Basophile Granulozyten	10 - 15	0 - 1,34
Eosinophile Granulozyten	12 - 17	
Neutrophile Granulozyten		
- Myelozyten	10 - 15	-
- stabkernige	10 - 15	0 - 3,86
- segmentkernige	10 - 15	21,4 - 49
Lymphozyten	6 - 18	46,7 - 75,1
Monozyten	14 - 22	0 - 2,52

### 2.7.3.6 Eiweißgehalt

Im Plasma, in den Vollblutüberständen und in den Zellkulturüberständen wurden die Proteinkonzentrationen mittels der Biuret-Reaktion nach Weichselbaum (1946) bestimmt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm mit dem UV/VIS Spektralphotometer DU®640 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) gemessen.

## 2.8 Statistik

---

Von 17 Durchgängen wurden 16 Durchgänge in die statistische Auswertung miteinbezogen. Der erste Durchgang wurde als Vorversuch gewertet, da es anschließend Änderungen im Versuchsablauf gab. Zudem musste in einem der Durchgänge ein Tier der Behandlungsgruppe AF, aufgrund von Krankheit, vorzeitig getötet werden. Für alle anderen Behandlungsgruppen konnten 16 Tiere in die Auswertung miteinbezogen werden.

Die statistische Auswertung wurde mit der *SAS Software* Version 9.2 (SAS Institute Inc., 2009, Cary, NC, USA) durchgeführt. Die Normalverteilung der Daten sowie die deskriptive Statistik wurde mit der UNIVARIATEN Prozedur der *SAS Software* kalkuliert. UNIVARIAT bedeutet, dass die Messgröße eindimensional ist, auch wenn sie von mehreren Variablen abhängig ist. Die Daten der Parameter der HPA-Achse (ACTH, Cortisol, Nebennieren, Genexpression CRH und GR), des Immunsystems (Differentialblutbild, Eiweißgehalt, Immunglobuline, NK-Zellen, Lymphozytenproliferation, Zytokine), der Neurotransmitter und der Gewichtsmessungen wurden näherungsweise als normalverteilt angenommen und mit dem Varianzmodell (ANOVA, engl. für *analysis of variance*) *repeated measurements* und der Prozedur GLIMMIX analysiert. Messwiederholungen am gleichen Tier wurden durch die Option *random residual* berücksichtigt und so die Blockdiagonalstruktur der Restkovarianzmatrix ermittelt.

Für das verwendete Varianzmodell (ANOVA) wurden die festen Faktoren Durchgang, Behandlung und Zeitpunkt für folgende Parameter verwendet: ACTH, Plasmacortisol, Differentialblutbild, Eiweißgehalt, Immunglobuline, NK-Zellen, Lymphozytenproliferation und Zytokine. Der Faktor Zeitpunkt wird in den grafischen Darstellungen als Start (Tag -4) und Ende (Tag 31) bezeichnet und bezieht sich somit auf die Tage der Blutentnahme. Zudem wurden die Zweifach-Interaktionen Durchgang x Zeitpunkt und Behandlung x Zeitpunkt berechnet. Vorbedingung für die Interaktion ist, dass zwei unabhängige Faktoren (Durchgang, Zeitpunkt oder Behandlung) einen abhängigen Parameter (Parameter der HPA-Achse, des Immunsystems, Gewichte oder Neurotransmitter) vorher sagen, wobei die Wirkung des einen unabhängigen von der Ausprägung des anderen unabhängigen Faktors abhängt. Immer, wenn die Möglichkeit besteht, dass mindestens zwei Faktoren einen Parameter vorhersagen, kann eine Wechselwirkung auftreten. Die Aussagekraft der Interaktion wird mittels eines Signifikanztests (Tukey-Kramer) überprüft. Die Interaktion zweier Faktoren kann einen signifikanten Einfluss auf den zu untersuchenden Parameter haben, auch wenn die Faktoren im Einzelnen keinen signifikanten Einfluss zeigen.

Für die Parameter Nebennieren, Neurotransmitter und die Genexpression von CRH und GR wurden die festen Faktoren Durchgang und Behandlung für das ANOVA-Modell angewandt. Für die Datenanalyse des Speichelcortisols wurden Durchgang, Behandlung und Versuchsabschnitt als feste Faktoren gesetzt und alle Zweifach-Interaktionen berücksichtigt. Der Faktor Versuchsabschnitt ist durch die Probenentnahmetage v, h, w und e, wie in Kapitel 2.3 beschrieben, definiert.

Es wurden *least square means* (LSM) und deren Standardfehler für alle festen Effekte berechnet und paarweise mittels Tukey-Kramer Test geprüft. Die Ergebnisse wurden als signifikant unterschiedlich eingestuft bei  $p < 0,05$ . Die signifikanten Unterschiede wurden mit \* für  $p < 0,05$ , \*\* für  $p < 0,01$  und \*\*\* für  $p < 0,001$  angegeben. Tendenzen wurden mit †  $p < 0,1$  gekennzeichnet.

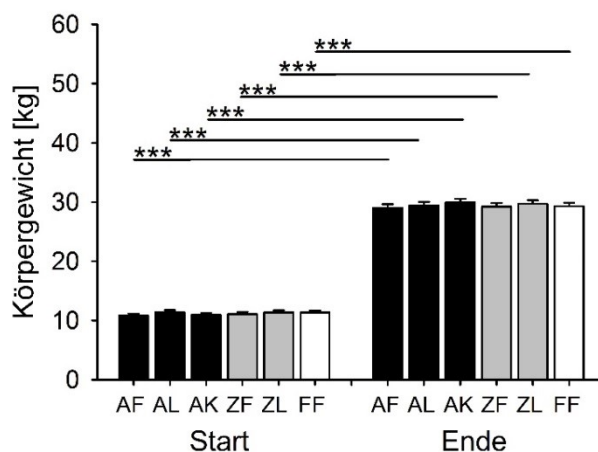
Für die Parameter Differentialblutbild, Eiweißgehalt, Immunglobuline, ACTH, NK-Zellen, Lymphozytenproliferation und Zytokine konnten zusätzlich Basalwerte ermittelt werden. Diese wurden durch eine Blutentnahme vor Versuchsbeginn (Tag -4) erhoben. Bei diesen Parametern konnte somit die Differenz aus Endwert und Startwert gebildet werden, die mit dem Tukey-Kramer Test geprüft wurde.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Allgemeiner Gesundheitszustand

##### 3.1.1 Körpergewicht

Innerhalb der 16 Durchgänge hatte der Faktor Lebenswoche einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung des Körpergewichts ( $F_{5,70} = 3645,47$ ;  $p < 0,001$ ). Der Faktor Durchgang und somit der Wurf-, der Sauen- sowie der Jahreszeiteffekt hatten einen signifikanten Einfluss auf die Gewichtsentwicklung ( $F_{14,70} = 2,80$ ;  $p < 0,01$ ). Die Schweine wiesen am Ende des Versuchs (10. LW) mit  $29,44 \pm 0,25$  kg ( $t_{70} = 119,98$ ;  $p < 0,001$ ) mehr als das Doppelte ihres Gewichts im Vergleich zum Beginn auf ( $11,14 \pm 0,15$  kg;  $t_{70} = 73,02$ ;  $p < 0,001$ ; 5. LW; Abb. 3.1). Der Faktor Behandlung hatte keinen Effekt ( $F_{5,70} = 0,27$ ;  $p = 0,93$ ) auf die Gewichte der Versuchstiere.



**Abb. 3.1 Entwicklung der Körpergewichte innerhalb des Versuchs.** Körpergewichte für die einzelnen Behandlungsgruppen (AF-Angekündigte Fütterung, AL-Angekündigter Luftstoß, AK-Angekündigter Konflikt, ZF-Zufällige Fütterung, ZL-Zufälliger Luftstoß, FF-Feste Fütterung) zum Start (5. LW) und zum Ende des Versuchs (10. LW); Signifikante Unterschiede sind mit \*\*\*  $p < 0,001$  angegeben;  $n = 15$  pro Behandlung.

##### 3.1.2 Eiweißgehalt

Der Eiweißgehalt wurde zur Kontrolle bestimmt, um beispielsweise Kontaminationen der Proben ausschließen zu können. Um den gesundheitlichen Allgemeinzustand zu überprüfen wurde der Eiweißgehalt im Blutplasma bestimmt.

Für die Auswertung der Daten der Analysen des Eiweißgehalts im Blutplasma, Vollblut und Zellkulturüberstand wurden die Werte von 16 Durchgängen verwendet.

Der Faktor Durchgang hatte sowohl im Plasma als auch im Vollblut- und Zellkulturüberstand einen signifikanten Einfluss auf den Eiweißgehalt. Der Einfluss des Zeitpunkts war nicht bei allen Parametern signifikant und wird daher separat dargestellt. Die Ergebnisse sind in der Tab. 3.1 zusammengefasst.

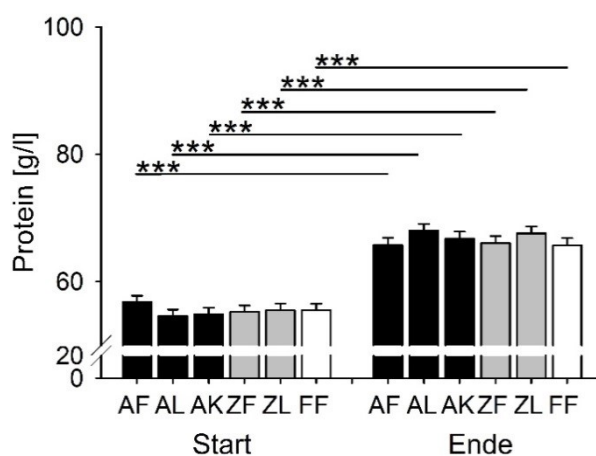
**Tab. 3.1 Durchgangseffekte und Effekte des Zeitpunkts für den Eiweißgehalt.** Eiweißgehalt im Plasma, in den Vollblutüberstände (VU) und den Zellkulturüberstände (ZKU).

Parameter		Durchgang	Zeitpunkt
<b>Eiweißgehalt</b>			
Plasma	unstimuliert	F = 9,75; p < 0,001	F = 405,45; p < 0,001
VU	unstimuliert	F = 15,86; p < 0,001	F = 37,54; p < 0,001
	LPS	F = 27,77; p < 0,001	F = 38,15; p < 0,001
ZKU	unstimuliert	F = 8,42; p < 0,001	F = 0,31; p = 0,59
	ConA	F = 5,67; p < 0,001	F = 0,74; p = 0,39
	PHA	F = 9,71; p < 0,001	F = 1,28; p = 0,26
	SEB	F = 13,85; p < 0,001	F = 4,72; p < 0,05

Der Faktor Zeitpunkt ( $F_{1,73} = 405,45$ ;  $p < 0,001$ ) und der Zeitpunkt innerhalb einer Behandlungsgruppe ( $p < 0,001$ ) hatten einen signifikanten Einfluss auf den Eiweißgehalt im Blutplasma, welcher im Verlauf des Experiments signifikant in allen Behandlungsgruppen anstieg. Zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.2). Dies konnte durch die Analyse der Differenzen des Eiweißgehalts im Blutplasma zum Ende und zum Start des Versuchs bestätigt werden. Diese zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.

Die Untersuchung der LPS-stimulierten Vollblutproben zeigte, dass der Zeitpunkt ( $F_{1,75} = 38,15$ ;  $p < 0,001$ ) und die Behandlungen ( $F_{5,75} = 3,84$ ;  $p < 0,01$ ) den Eiweißgehalt signifikant beeinflussten. Die Behandlungsgruppen ZL ( $t_{74} = -4,11$ ;  $p < 0,01$ ) und FF ( $t_{74} = -3,99$ ;  $p < 0,01$ ) zeigten einen signifikanten Anstieg des Eiweißgehalts zum Ende des Versuchs hin, während in den anderen Behandlungsgruppen der Anstieg nicht signifikant war. Die Analyse der Differenzen von End- und Startwerten des Eiweißgehalts im stimulierten Vollblut zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Der Eiweißgehalt des unstimulierten Ansatzes der Vollblutüberstände (Kontrolle) wurde signifikant durch den Faktor Zeit ( $F_{1,75} = 37,54$ ;  $p < 0,001$ ) beeinflusst. Für die Behandlungsgruppen AL ( $t_{75} = -3,51$ ;  $p < 0,05$ ) und FF ( $t_{75} = -3,60$ ) konnte ein signifikanter Anstieg der Eiweißkonzentration in den Kontrollansätzen der Vollblutüberstände nachgewiesen werden. In allen anderen Gruppen stieg der Eiweißgehalt nicht signifikant an. Die Unterschiede zwischen den Behandlungen waren nicht signifikant und dementsprechend konnte auch kein signifikanter Einfluss der Behandlung innerhalb der Analyse der Differenzen von End- und Startwerten der Vollblutüberstände gezeigt werden.



**Abb. 3.2 Eiweißgehalt im Plasma.** Eiweißgehalt im Plasma für die jeweiligen Behandlungsgruppen (AF-Angekündigte Fütterung, AL-Angekündigter Luftstoß, AK-Angekündigter Konflikt, ZF-Zufällige Fütterung, ZL-Zufälliger Luftstoß, FF-Feste Fütterung) zum Start (vier Tage vor dem Beginn des Experiments) und zum Ende des Experiments; Signifikante Unterschiede sind mit \*\*\*  $p < 0,001$  angegeben;  $n = 16$  pro Behandlung.

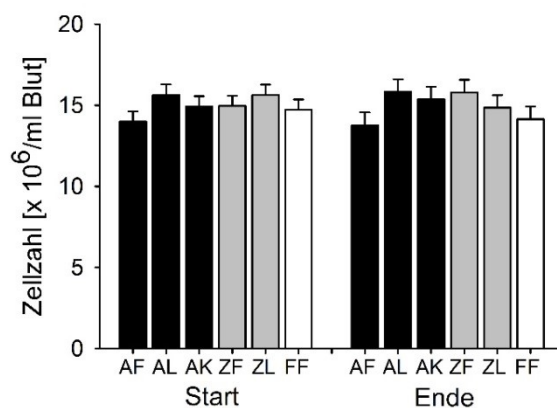
Die Ergebnisse der Zellkulturüberstandsanalysen zeigten einen Haupteffekt des Zeitpunkts nach der Stimulation mit SEB ( $F_{1,74} = 4,72$ ;  $p < 0,05$ ) sowie einen Behandlungseffekt ( $F_{5,74} = 5,70$ ;  $p < 0,001$ ). Der Eiweißgehalt stieg zum Versuchsende an. Zum Ende des Versuchs war der Eiweißgehalt im Zellkulturüberstand der Behandlungsgruppen AF und AL signifikant höher als der der FF-Gruppe (AF > FF  $t_{73} = 4,85$ ;  $p < 0,001$ ; AL > FF  $t_{73} = 3,67$ ;  $p < 0,05$ ). Die Differenzen (End- minus Startwerte) des Eiweißgehalts im Zellkulturüberstand der verschiedenen Behandlungsgruppen unterschieden sich jedoch nicht signifikant. Die Zellkulturüberstände, die mit ConA oder PHA stimuliert wurden, zeigten in Abhängigkeit von Zeitpunkt und Behandlungen keine Änderungen im Eiweißgehalt. Die Kontrollen der Zellkulturüberstände (unstimulierter Ansatz) zeigten keinen erhöhten Eiweißgehalt und somit

keine signifikanten Effekte. Die Differenzen der End- und Startwerte des Eiweißgehalts in den Zellkulturüberständen zeigten für keinen der Ansätze (stimuliert oder unstimuliert) signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.

Die Ergebnisse der Eiweißbestimmung zeigen, dass die Proben nicht kontaminiert waren.

### 3.1.3 Leukozytenzahl

Die Leukozytenzahl innerhalb der untersuchten 16 Durchgänge wurde durch die verschiedenen Behandlungen ( $F_{5,75} = 1,68$ ;  $p = 0,15$ ) und den Zeitpunkt ( $F_{1,75} = 0,002$ ;  $p = 0,97$ ) nicht signifikant beeinflusst (Abb. 3.3). Sie blieb auf einem konstanten Niveau von durchschnittlich ca.  $14,9 \times 10^6$  Zellen.



**Abb. 3.3 Leukozytenzahl.** Zellzahl von Leukozyten im Blut zum Start (vier Tage vor Versuchsbeginn) und zum Ende des Experiments für alle Behandlungsgruppen (AF-Angekündigte Fütterung, AL-Angekündigter Luftstoß, AK-Angekündigter Konflikt, ZF-Zufällige Fütterung, ZL-Zufälliger Luftstoß, FF-Feste Fütterung). Keine signifikanten Unterschiede;  $n = 16$  pro Behandlung.

### 3.1.4 Tiergesundheit

Innerhalb der 16 Durchgänge traten bei einzelnen Tieren, vor allem während der ersten Versuchswochen, Durchfallerkrankungen (Diarrhö) auf. Einmalig war für die weitere Therapie der Einsatz eines Antibiotikums (Trimetosele) notwendig (Tab. 3.2). Vereinzelt wurden bei den Schweinen ein Abszess am Bauch sowie eine Schwellung des vorderen rechten Fußes festgestellt. Weiterhin traten, ebenfalls vereinzelt, Verstopfung (Obstipation), Appetitlosigkeit (Inappetenz), Verletzungen des Sprunggelenks und ein entzündeter After auf. Die Inappetenz wurde nach längerem Fortbestand (acht Tage) mit der Gabe von Dexatrat (Antibiotikum) behandelt. Im Durchgang 14 musste nach vorhergehender antibiotischer Behandlung mit Metapyrin und Trimetosele das Tier der Behandlungsgruppe AF eingeschläfert werden. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die erkrankten Tiere und die erfolgten Therapien.

**Tab. 3.2 Übersicht Tiergesundheit.** Es wurden die Erkrankungen der Tiere, der Durchgang, die zugehörige Behandlungsgruppe (AF-Angekündigte Fütterung, AL-Angekündigter Luftstoß, AK-Angekündigter Konflikt, ZF-Zufällige Fütterung, ZL-Zufälliger Luftstoß, FF-Feste Fütterung), die Versuchswoche (VW) und, wenn erfolgt, auch die Medikation erfasst. Die 1. VW startete mit Tag (d) 0 und endete mit d 6, die 2. VW mit d 7 und d 13, 3. VW mit d 14 und d 20, die 4. VW mit d 21 und d 27 und die 5. VW mit d 28 und d 34 (Versuchsende).

Durchgang/ Behandlung	VW	Erkrankung	Medikation
1/ FF	1	Diarrhö	Carbophen ins Futter
2/ AF, AL, AK, ZF, ZL, FF	1	Diarrhö	Carbophen, dann 3 d 2x 1 ml Trimethosel (i. m.)
2/ ZL	1	After entzündet	Lebertransalbe für den After
3/ AL	2-4	Diarrhö	Carbophen
3/ AK	1	Obstipation	keine
3/ ZF	1	Diarrhö	Carbophen
3/ ZL	3-4	Diarrhö;	Carbophen
	4	wirkt krank	
4/ AF, AL, AK, ZF, ZL, FF	1	Diarrhö	Carbophen
5 AF	1-2	Entzündung Auge	mit phys. Kochsalzlösung gespült
5/ AL	5	Husten; wirkt krank, keine erhöhte Temp.	
5/ AK	1	Diarrhö	Carbophen
6/ AL	1	Diarrhö;	Carbophen
	2-3	Inappetenz	1x 1 ml Dexatrat
7/ AK	1	Diarrhö	Carbophen
7/ ZL	1-2	Abszess hinteres rechtes Bein	Kampfersalbe
7/ FF	1	Diarrhö	Carbophen
8/ AF	1-2	Ödem vorderer rechter Fuß	Kampfersalbe
8/ AL, AF, ZF	1	Diarrhö	Carbophen
8/AK	2	Diarrhö	Carbophen

Durchgang/ Behandlung	VW	Erkrankung	Medikation
9/ AL	1	Diarrhö	Carbophen
10/ ZL	3-4	Abszess Bauch	Kampfersalbe
10/ FF	2 & 4	Obstipation	Rapsöl ins Futter
11/ AF	1-2	Diarrhö	Carbophen
11/ AL	2	Entzündung vorderes rechtes Sprunggelenk	
11/ AK	4	Abszess Bauch	
11/ ZL, FF	2	Diarrhö	Carbophen
12/ AL	1-3	Diarrhö	Carbophen
12/ AF,AK	1	Diarrhö	Carbophen
12/ ZF	1 & 3	Diarrhö	Carbophen
12/ FF	3	Diarrhö	Carbophen
13/ AK	3	Diarrhö	Carbophen
13/ ZF	1	Diarrhö	Carbophen
13/ ZL	1-2	Auge verklebt;	mit phys. Kochsalzlösung gespült
	3	Diarrhö	Carbophen
13/ FF	1-3 & 5	Diarrhö	Carbophen
14/ AF	2-3	krank	3 d je 1,5 ml Metapyrin und Trimethosel i. m.;
	3		eingeschläfert
15/ ZF	1 & 3	Diarrhö	Carbophen
15/ FF	3	Diarrhö	Carbophen
16/ ZL, FF	1-2	Diarrhö	Carbophen
17/ AL	2	Diarrhö	Carbophen
17/ ZF	1	Diarrhö	Carbophen
17/ FF	2	Erbrochen, krank	2 ml Metapyrin (1d) + 1,5 ml Trimethosel (3d) i. m.

### 3.2. Physiologische Parameter der HPA-Achse

#### 3.2.1 Einfluss der einzelnen Faktoren und ihrer Interaktionen auf die Parameter der HPA-Achse

Bei der Analyse der Parameter der HPA-Achse konnten für die Parameter ACTH, die Cortisol- und Nebennierendaten signifikante Durchgangseffekte nachgewiesen werden (Tab. 3.3). Die Genexpression von CRH und GR sowie das relative Nebennierengewicht wurden jedoch nicht signifikant von den Durchgängen beeinflusst.

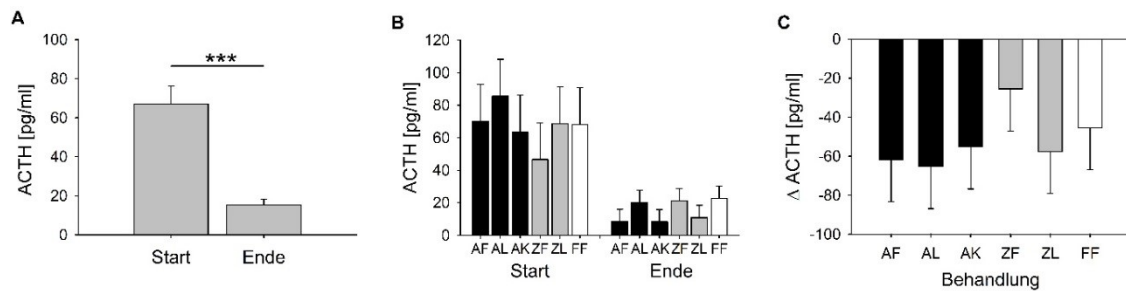
Tab. 3.3 Durchgangseffekte auf die Parameter der HPA-Achse.

Parameter		Durchgang
<b>ACTH</b>		$p < 0,01$
<b>Cortisol</b>		
	Plasma	$p < 0,01$
	Speichel	$p < 0,001$
<b>Genexpression</b>		
	CRH	Amygdala $p = 0,08$ Hypothalamus $p = 0,73$
	GR	Amygdala $p = 0,24$ Hippocampus $p = 0,08$ Hypothalamus $p = 0,73$
<b>Nebennieren</b>		
	rel. Nebennierengewicht	$p = 0,06$
	Nebennierenfläche	$p < 0,05$
	Fläche	Rinde $p < 0,05$ Mark $p < 0,05$
	Verhältnis	Rinde/Mark $p < 0,05$
	Zelldichte	Rinde $p < 0,001$ Mark $p < 0,01$

### 3.2.2 ACTH

Das Adrenocorticotrophe Hormon (ACTH) wird vermehrt bei Stress gebildet und ist daher ein etablierter Indikator für die Stressinduktion.

Die Ergebnisse der ACTH-Analysen von neun Durchgängen zeigen einen signifikanten Effekt des Zeitpunkts auf die Konzentration des ACTHs ( $F_{1,40} = 34,62$ ,  $p < 0,001$ ; Abb. 3.4 A). Die Konzentration des ACTHs im Plasma war demnach am Ende des Experiments, unabhängig von der Behandlungsgruppe, signifikant niedriger als zu Beginn ( $t_{40} = 5,88$ ,  $p < 0,001$ ). Dass die ACTH-Konzentrationen in den einzelnen Behandlungsgruppen zum Ende des Versuchs niedriger als zum Start waren, verdeutlicht die Abbildung 3.4 B. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (AF:  $p = 0,19$ ; AL:  $p = 0,14$ ; AK:  $p = 0,34$ ; ZF:  $p = 0,99$ ; ZL:  $p = 0,28$ ; FF:  $p = 0,62$ ). Die verschiedenen Behandlungen hatten keinen Einfluss auf die ACTH-Konzentration im Plasma. Dies spiegelt sich auch in der Darstellung der Differenzen der ACTH-Konzentrationen wider (Abb. 3.4 C).



**Abb. 3.4 ACTH-Konzentrationen im Plasma.** **A** ACTH-Konzentration für alle Behandlungsgruppen zusammen vier Tage vor Beginn (Start) und zum Ende des Experiments; **B** ACTH-Konzentrationen der einzelnen Behandlungsgruppen (AF-Angekündigte Fütterung, AL-Angekündigter Luftstoß, AK-Angekündigter Konflikt, ZF-Zufällige Fütterung, ZL-Zufälliger Luftstoß, FF-Feste Fütterung) zum Start und zum Ende des Experiments; **C** Differenzen (End- minus Startwerte) der ACTH-Konzentrationen der einzelnen Behandlungsgruppen; Signifikante Unterschiede sind mit \*\*\*  $p < 0,001$  angegeben;  $n = 9$  pro Behandlung.

### 3.2.3 Cortisol

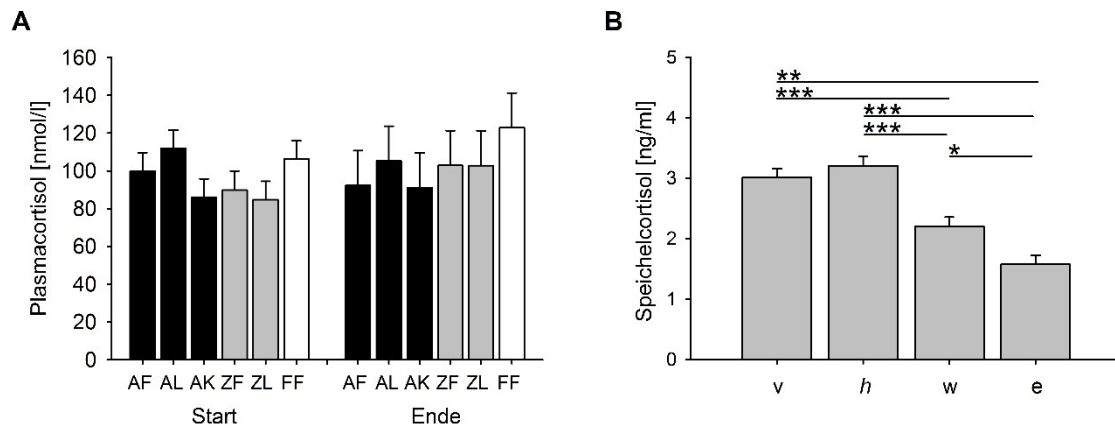
Ein weiterer Indikator für Stress ist der Anstieg des Cortisolspiegels. Das Glucocorticoid wurde sowohl im Plasma als auch im Speichel nachgewiesen. Für die Auswertung wurden Daten von elf Durchgängen (Plasma) bzw. acht Durchgängen (Speichel) genutzt.

#### **Plasma**

Die Plasmaproben wurden drei Tage vor Beginn und zum Ende des Experiments genommen. So wurde überprüft, ob die Tiere durch das Experiment chronischem Stress ausgesetzt waren. Die Analysen der Cortisolkonzentrationen im Plasma ergaben, dass weder die verschiedenen Behandlungen ( $F_{5,45} = 0,64$ ,  $p = 0,67$ ) noch der Zeitpunkt ( $F_{1,45} = 0,91$ ,  $p = 0,35$ ) einen signifikanten Einfluss hatten (Abb. 3.5 A). Auch die Betrachtung der Differenzen zeigte, dass die Behandlungen keinen Langzeiteffekt auf die Cortisolkonzentrationen im Plasma hatten.

#### **Speichel**

Die Cortisolkonzentrationen im Speichel wurden nicht signifikant durch die verschiedenen Behandlungen beeinflusst ( $F_{5,36} = 1,11$ ,  $p = 0,371$ ), jedoch konnte ein signifikanter Haupteffekt des Versuchsabschnitts nachgewiesen werden ( $F_{3,96} = 27,63$ ,  $p < 0,001$ ). Die Cortisolkonzentrationen sanken signifikant in allen Behandlungsgruppen im Verlauf des Experiments (Abb. 3.5 B).

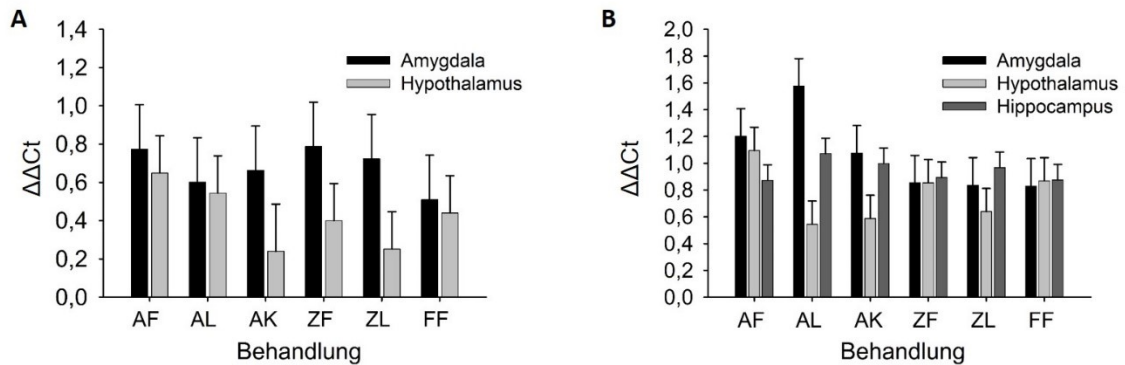


**Abb. 3.5 Cortisolkonzentrationen im Verlauf des Experiments.** **A** Cortisolkonzentrationen im Plasma für die einzelnen Behandlungsgruppen vier Tage vor und zum Ende des Experiments; **B** Cortisolkonzentrationen im Speichel für alle Behandlungen (AF-Angekündigte Fütterung, AL-Angekündigter Luftstoß, AK-Angekündigter Konflikt, ZF-Zufällige Fütterung, ZL-Zufälliger Luftstoß, FF-Feste Fütterung) vor dem Start (v), während der Handlingphase (h), während des Experiments (w) und zum Ende des Experiments (e); Signifikante Unterschiede sind mit \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$  angegeben; Plasma:  $n = 11$  pro Behandlung, Speichel:  $n = 8$  pro Behandlung.

### 3.2.4 Genexpression von CRH und GR

Bei Stress erhöht sich die mRNA-Expression von CRH und GR. Diese kann mittels qPCR untersucht werden. Es wurde die Genexpression von drei Durchgängen analysiert.

Die Expression von CRH und GR in den Geweben Amygdala, Hypothalamus und Hippocampus wurde nicht signifikant durch die verschiedenen Behandlungen beeinflusst (Abb. 3.6;  $n = 3$ ). Auffällig ist jedoch die im Vergleich zu der Behandlungsgruppe ZL und der Kontrolle FF erhöhte Expression von GR in der Amygdala für die Behandlungsgruppe AL (AL/ZL:  $p = 0,197$ ; AL/FF:  $p = 0,190$ ), auch wenn diese nicht signifikant ist.

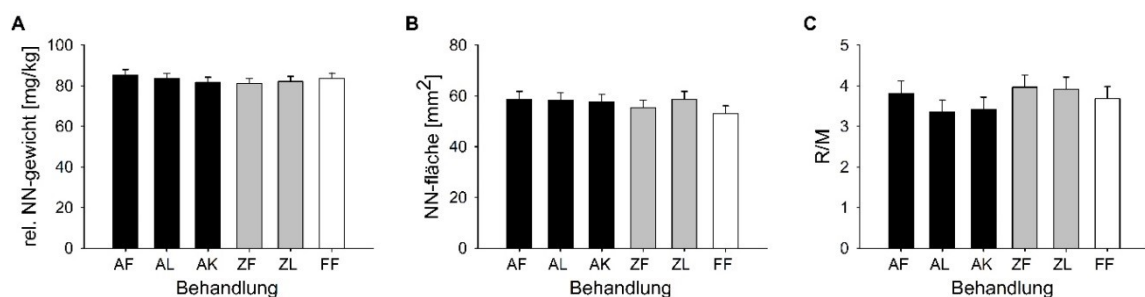


**Abb. 3.6 Genexpression von CRH und GR.** **A** Genexpression von CRH in der Amygdala (schwarz) und im Hypothalamus (grau) für die verschiedenen Behandlungsgruppen (AF-Angekündigte Fütterung, AL-Angekündigter Luftstoß, AK-Angekündigter Konflikt, ZF-Zufällige Fütterung, ZL-Zufälliger Luftstoß, FF-Feste Fütterung) am Ende des Experiments. Die n-fache Expression wird durch den  $\Delta\Delta Ct$ -Wert angegeben; **B** Genexpression von GR in der Amygdala (schwarz), im Hippocampus (hellgrau) und im Hypothalamus (grau) für die verschiedenen Behandlungsgruppen am Ende des Experiments. Die n-fache Expression wird durch den  $\Delta\Delta Ct$ -Wert angegeben; Keine signifikanten Unterschiede; n = 3 pro Behandlung.

### 3.2.5 Nebennieren

Da chronischer Stress die Morphologie der Nebennieren beeinflusst, wurden Gewicht, Fläche und Zelldichte der Nebennieren in Abhängigkeit der verschiedenen Behandlungen untersucht.

Die Untersuchungen der Nebennieren zeigten keine signifikanten Änderungen des relativen Gewichts, der Fläche der Nebennieren sowie des Verhältnisses von Rindenfläche zur Markfläche (R/M) in Abhängigkeit von der Behandlung (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7 Einfluss der Behandlungen auf das relative Nebennierengewicht, die Nebennierenfläche und das Verhältnis von Rinden- zu Markfläche.** **A** Relatives Nebennieren (NN)-gewicht in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe (AF-Angekündigte Fütterung, AL-Angekündigter Luftstoß, AK-Angekündigter Konflikt, ZF-Zufällige Fütterung, ZL-Zufälliger Luftstoß, FF-Feste Fütterung); **B** Nebennieren (NN)-fläche in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe; **C** Das Verhältnis von Rindenfläche (R) zur Markfläche (M) in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe; Keine signifikanten Unterschiede vorhanden; relatives NN-gewicht: n = 15 pro Behandlung; NN-fläche: n = 9 pro Behandlung; R/M: n = 9 pro Behandlung.

Die Zelldichte und Fläche in Mark und Rinde der Nebennieren wurden ebenfalls nicht signifikant durch die Behandlungsgruppen beeinflusst (Tab. 3.4). Die Behandlungen hatten demnach keinen Einfluss auf die Nebennierenanatomie.

**Tab. 3.4 Nebennieren.** Einfluss der verschiedenen Behandlungen (AF-Angekündigte Fütterung, AL-Angekündigter Luftstoß, AK-Angekündigter Konflikt, ZF-Zufällige Fütterung, ZL-Zufälliger Luftstoß, FF-Feste Fütterung) auf das relative Gewicht der Nebennieren, die gesamte Fläche der Nebennieren, die Teilflächen Rinde und Mark sowie auf deren Verhältnis zueinander und auf die Zelldichte in Rinde und Mark. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM  $\pm$  SE. n pro Behandlung.

	n	Behandlungen					
		AF	AL	AK	ZF	ZL	FF
<b>relatives Nebennierengewicht, mg/kg Körpergewicht</b>	15	2,95 $\pm$ 0,16	3,06 $\pm$ 0,16	2,70 $\pm$ 0,16	2,84 $\pm$ 0,16	2,82 $\pm$ 0,16	2,79 $\pm$ 0,16
<b>Nebennierenfläche [mm<sup>2</sup>]</b>	9	58,70 $\pm$ 3,07	58,25 $\pm$ 3,07	57,58 $\pm$ 3,07	55,26 $\pm$ 3,07	58,71 $\pm$ 3,07	53,06 $\pm$ 3,07
<b>Rindenfläche (R) [mm<sup>2</sup>]</b>	9	45,97 $\pm$ 2,62	44,13 $\pm$ 2,62	43,85 $\pm$ 2,62	43,75 $\pm$ 2,62	46,48 $\pm$ 2,62	41,16 $\pm$ 2,62
<b>Markfläche (M) [mm<sup>2</sup>]</b>	9	12,73 $\pm$ 1,04	14,12 $\pm$ 1,04	13,73 $\pm$ 1,04	11,51 $\pm$ 1,04	12,23 $\pm$ 1,04	11,91 $\pm$ 1,04
<b>R/M</b>	9	3,82 $\pm$ 0,30	3,35 $\pm$ 0,30	3,41 $\pm$ 0,30	3,96 $\pm$ 0,30	3,90 $\pm$ 0,30	3,68 $\pm$ 0,30
<b>Zelldichte Rinde [Zellen/mm<sup>2</sup>]</b>	10	5121,60 $\pm$ 148,24	5226,13 $\pm$ 148,24	5226,67 $\pm$ 148,24	5580,27 $\pm$ 148,24	5167,47 $\pm$ 148,24	5116,80 $\pm$ 148,24
<b>Zelldichte Mark [Zellen/mm<sup>2</sup>]</b>	10	6364,27 $\pm$ 179,50	6365,87 $\pm$ 179,50	6119,47 $\pm$ 179,50	6302,40 $\pm$ 179,50	6183,47 $\pm$ 179,50	6158,93 $\pm$ 179,50

### 3.3 Neurotransmitter

Neurotransmitter steuern die Stimmung und das Stressempfinden. Es wurde untersucht, ob die verschiedenen Behandlungen einen Einfluss auf die Konzentration der Neurotransmitter in den Hirnregionen NAc, PFC und VTA haben.

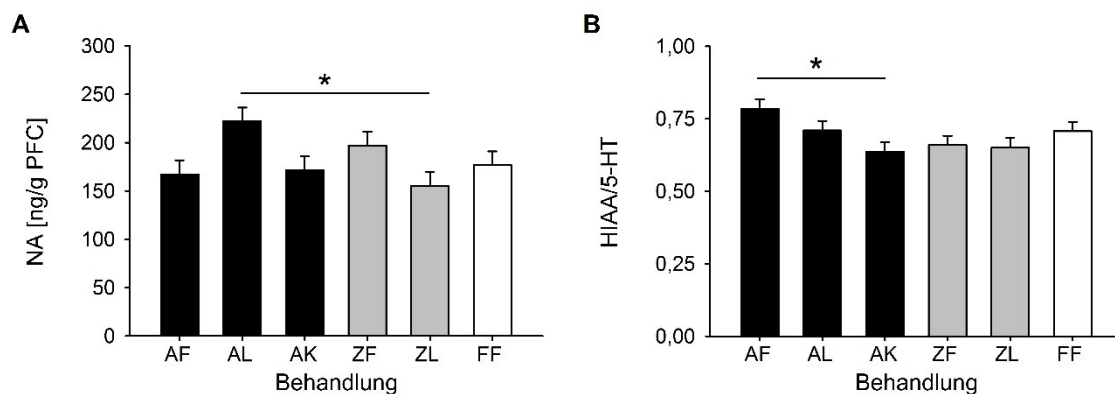
Die Daten von 16 Durchgängen gingen in die Auswertung mit ein. Nicht alle Neurotransmitter wurden signifikant von Durchgangseffekten beeinflusst. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle (Tab. 3.5) zusammengestellt.

**Tab. 3.5 Durchgangseffekte auf die Neurotransmitter.** Einfluss der Durchgänge auf die Konzentrationen der Neurotransmitter und deren Metaboliten (DA-Dopamin, DOPAC-3,4-Dihydroxyphenylethylsäure, HVA-Homovanillinsäure, 5-HT-Serotonin, HIAA-5-Hydroxyindol-3-Ethylsäure; NA-Noradrenalin) in verschiedenen Hirnregionen.

<b>Gewebe</b>	<b>Neurotransmitter</b>	<b>Durchgang</b>
<b><i>Nucleus accumbens</i></b>	DA	p = 0,32
	DOPAC	p = 0,52
	DOPAC/DA	p < 0,01
	HVA	p = 0,58
	HVA/DA	p < 0,001
	5-HT	p < 0,01
	HIAA	p < 0,01
	HIAA/5-HT	p < 0,001
	NA	p = 0,11
<b>Präfrontaler Cortex</b>	DA	p < 0,01
	DOPAC	p < 0,001
	DOPAC/DA	p < 0,001
	HVA	p < 0,001
	HVA/DA	p < 0,001
	5-HT	p < 0,001
	HIAA	p < 0,01
	HIAA/5-HT	p < 0,01
	NA	p = 0,07
<b>Ventrales Tegmentum</b>	DA	p < 0,05
	DOPAC	p < 0,05
	DOPAC/DA	p = 0,11
	HVA	p < 0,05
	HVA/DA	p < 0,01
	5-HT	p < 0,001
	HIAA	p < 0,001
	HIAA/5-HT	p = 0,13
	NA	p < 0,001

Die Konzentrationen der Neurotransmitter NA, DA und dessen Metaboliten DOPAC und HVA sowie 5-HT und dessen Metabolit 5-HIAA wurden im **NAc** durch die verschiedenen Behandlungen weder signifikant erhöht noch gesenkt. Auffällig ist, dass die Behandlungsgruppe ZF die numerisch höchsten Mittelwerte für die Neurotransmitter DOPAC (AF/ZF:  $p = 0,523$ ; ZF/FF:  $p = 0,561$ ), DA (AF/ZF:  $p = 0,585$ ; ZF/FF:  $p = 0,643$ ) und HVA (AF/ZF:  $p = 0,748$ ; ZF/FF:  $p = 0,730$ ) im Vergleich zur Behandlungsgruppe AF und zur Kontrolle FF hat (Tab. 3.6).

Im **PFC** waren die NA-Konzentrationen signifikant höher nach der AL-Behandlung im Vergleich zur ZL-Gruppe ( $t_{74} = 3,36$ ,  $p < 0,05$ ; Abb. 3.8 A, Tab. 3.6). Die verschiedenen Behandlungen beeinflussten die DA-, die DOPAC-, die HVA-, die 5-HT und die 5-HIAA-Konzentrationen im PFC nicht signifikant.



**Abb. 3.8 Einfluss der Behandlungsgruppen auf die Konzentration des Neurotransmitters NA im PFC und auf das Verhältnis von HIAA/5-HT im VTA.** **A** Einfluss der verschiedenen Behandlungsgruppen (AF-Angekündigte Fütterung, AL-Angekündigter Luftstoß, AK-Angekündigter Konflikt, ZF-Zufällige Fütterung, ZL-Zufälliger Luftstoß, FF-Feste Fütterung) auf die Konzentration von Noradrenalin (NA) im Präfrontalen Cortex (PFC) **B** Einfluss der verschiedenen Behandlungsgruppen auf das Verhältnis von Homovanillinsäure (HIAA) zu Serotonin (5-HT) im ventralen Tegmentum (VTA); Signifikante Unterschiede sind mit \*  $p < 0,05$  angegeben;  $n = 16$  pro Behandlung.

Die Ergebnisse der **VTA**-Analysen zeigten einen signifikanten Haupteffekt der Behandlung auf das Verhältnis von 5-HIAA zu 5-HT ( $F_{5,71} = 2,77$ ;  $p < 0,05$ ). Zudem konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen AF und AK ermittelt werden, wobei das 5-HIAA/5-HT-Level in der AF-Gruppe signifikant höher als in der AK-Gruppe war ( $t_{71} = 3,17$ ,  $p < 0,05$ ; Abb. 3.8 B, Tab. 3.6). Die Konzentrationen der restlichen Neurotransmitter und deren Metaboliten wurden nicht signifikant durch die Behandlungen beeinflusst. Auffällig ist auch hier, dass die Behandlungsgruppe ZL die numerisch niedrigsten Mittelwerte für die Neurotransmitter DOPAC (AL/ZL:  $p = 0,756$ ; ZL/FF:  $p = 0,358$ ), DA (AL/ZL:  $p = 0,780$ ; ZL/FF:  $p = 0,553$ ) und HVA (AL/ZL:  $p = 0,652$ ; ZL/FF:  $p = 0,437$ ) im Vergleich zu der Behandlungsgruppe AL und der Kontrolle FF aufweist (Tab. 3.6).

**Tab. 3.6 Least square means der Konzentrationen der verschiedenen Neurotransmitter in den Hirnregionen NAc, PFC und VTA für die verschiedenen Behandlungen.** Behandlungsspezifische (AF-Angekündigte Fütterung, AL-Angekündigter Luftstoß, AK-Angekündigter Konflikt, ZF-Zufällige Fütterung, ZL-Zufälliger Luftstoß, FF-Feste Fütterung) Neurotransmitterkonzentrationen (DA-Dopamin, DOPAC-3,4-Dihydroxyphenylethylamin, HVA-Homovanillinsäure, 5-HT-Serotonin, HIAA-5-Hydroxyindol-3-Essigsäure; NA-Noradrenalin) in den Hirnregionen *Nucleus accumbens* (NAc) in pg/mg, Präfrontaler Cortex (PFC) in ng/g und dem ventralen Tegmentum (VTA) in pg/mg angegeben. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM  $\pm$  SE mit n = 16 pro Behandlung. Signifikante Unterschiede sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet und fett gedruckt. Auffällige, aber nicht signifikante, Werte sind kursiv gedruckt.

	Behandlungen					
	AF	AL	AK	ZF	ZL	FF
<b>NAc</b>						
DA	324,3 $\pm$ 82,7	312,9 $\pm$ 79,6	349,0 $\pm$ 79,6	<i>510,9 <math>\pm</math> 79,6</i>	338,5 $\pm$ 82,7	338,1 $\pm$ 79,6
DOPAC	94,3 $\pm$ 39,6	100,5 $\pm$ 38,1	100,4 $\pm$ 38,1	<i>188,9 <math>\pm</math> 38,1</i>	99,9 $\pm$ 39,6	99,4 $\pm$ 38,1
DOPAC/D A	0,29 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,02
HVA	440,8 $\pm$ 108,3	472,4 $\pm$ 104,4	437,4 $\pm$ 104,3	<i>646,0 <math>\pm</math> 104,3</i>	439,1 $\pm$ 108,3	440,3 $\pm$ 104,3
HVA/DA	1,36 $\pm$ 0,10	1,54 $\pm$ 0,10	1,30 $\pm$ 0,10	1,32 $\pm$ 0,10	1,37 $\pm$ 0,10	1,36 $\pm$ 0,10
5-HT	1307,5 $\pm$ 108,3	1236,2 $\pm$ 62,4	1289,7 $\pm$ 62,4	1333,4 $\pm$ 62,4	1317,2 $\pm$ 64,9	1357,9 $\pm$ 62,4
HIAA	630,0 $\pm$ 28,7	619,9 $\pm$ 27,6	592,0 $\pm$ 27,6	601,1 $\pm$ 27,6	612,9 $\pm$ 28,7	644,5 $\pm$ 27,6
HIAA/5- HT	0,49 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,02	0,46 $\pm$ 0,02	0,46 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,02	0,50 $\pm$ 0,02
NA	3952,1 $\pm$ 186,6	3863,1 $\pm$ 179,5	4018,8 $\pm$ 179,5	3921,9 $\pm$ 179,5	4018,4 $\pm$ 186,6	4022,7 $\pm$ 179,5
<b>PFC</b>						
DA	10,0 $\pm$ 0,8	12,6 $\pm$ 0,8	11,8 $\pm$ 0,8	11,4 $\pm$ 0,8	11,0 $\pm$ 0,8	10,8 $\pm$ 0,8
DOPAC	11,1 $\pm$ 1,1	12,7 $\pm$ 1,0	10,3 $\pm$ 1,0	11,0 $\pm$ 1,0	11,1 $\pm$ 1,0	11,6 $\pm$ 1,0
DOPAC/D A	1,13 $\pm$ 0,07	0,99 $\pm$ 0,06	0,91 $\pm$ 0,06	0,99 $\pm$ 0,06	1,01 $\pm$ 0,06	1,13 $\pm$ 0,06
HVA	26,2 $\pm$ 2,4	31,0 $\pm$ 2,3	27,7 $\pm$ 2,3	26,9 $\pm$ 2,3	27,8 $\pm$ 2,3	29,5 $\pm$ 2,3
HVA/DA	2,63 $\pm$ 0,17	2,45 $\pm$ 0,16	2,45 $\pm$ 0,16	2,49 $\pm$ 0,16	2,63 $\pm$ 0,16	2,78 $\pm$ 0,16
5-HT	180,7 $\pm$ 8,7	210,6 $\pm$ 8,4	211,5 $\pm$ 8,4	199,1 $\pm$ 8,4	202,1 $\pm$ 8,4	207,0 $\pm$ 8,4
HIAA	49,2 $\pm$ 1,9	55,6 $\pm$ 1,8	50,2 $\pm$ 1,8	53,8 $\pm$ 1,8	51,0 $\pm$ 1,8	53,3 $\pm$ 1,8
HIAA/5- HT	0,28 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,01
NA	167,2 $\pm$ 14,6 <sup>a, b</sup>	<b>222,2 <math>\pm</math> 14,1<sup>a</sup></b>	171,8 $\pm$ 14,1 <sup>a, b</sup>	197,2 $\pm$ 14,1 <sup>a, b</sup>	<b>155,4 <math>\pm</math> 14,1<sup>b</sup></b>	176,9 $\pm$ 14,1 <sup>a, b</sup>
<b>VTA</b>						
DA	227,9 $\pm$ 71,7	252,4 $\pm$ 72,0	256,8 $\pm$ 72,0	211,7 $\pm$ 69,0	<i>120,6 <math>\pm</math> 72,0</i>	287,6 $\pm$ 69,0
DOPAC	166,1 $\pm$ 35,7	175,5 $\pm$ 35,9	176,0 $\pm$ 35,9	144,1 $\pm$ 34,4	<i>107,8 <math>\pm</math> 35,9</i>	206,6 $\pm$ 34,4
DOPAC/D A	1,30 $\pm$ 0,12	0,96 $\pm$ 0,13	0,94 $\pm$ 0,13	0,99 $\pm$ 0,12	1,02 $\pm$ 0,13	1,20 $\pm$ 0,12
HVA	669,0 $\pm$ 86,3	722,4 $\pm$ 86,6	690,5 $\pm$ 86,6	602,6 $\pm$ 83,0	538,1 $\pm$ 86,6	760,8 $\pm$ 83,0
HVA/DA	7,60 $\pm$ 0,94	4,75 $\pm$ 0,94	5,45 $\pm$ 0,94	4,89 $\pm$ 0,90	5,50 $\pm$ 0,94	6,47 $\pm$ 0,90
5-HT	486,5 $\pm$ 50,7	627,1 $\pm$ 50,9	639,2 $\pm$ 50,9	675,3 $\pm$ 48,8	612,2 $\pm$ 50,9	654,7 $\pm$ 48,8
HIAA	368,8 $\pm$ 27,4	439,4 $\pm$ 27,5	398,7 $\pm$ 27,5	414,8 $\pm$ 26,4	396,9 $\pm$ 27,5	438,9 $\pm$ 26,4
HIAA/5- HT	<b>0,78 <math>\pm</math> 0,03<sup>a</sup></b>	0,71 $\pm$ 0,03 <sup>a, b</sup>	<b>0,64 <math>\pm</math> 0,03<sup>b</sup></b>	0,66 $\pm$ 0,03 <sup>a, b</sup>	0,65 $\pm$ 0,03 <sup>a, b</sup>	0,71 $\pm$ 0,03 <sup>a, b</sup>
NA	572,0 $\pm$ 73,2	588,0 $\pm$ 73,5	564,5 $\pm$ 73,5	745,4 $\pm$ 70,4	687,9 $\pm$ 73,5	587,9 $\pm$ 70,4

### 3.4 Physiologische Parameter des Immunsystems

#### 3.4.1 Einfluss des Faktors Durchgang auf die Immunparameter

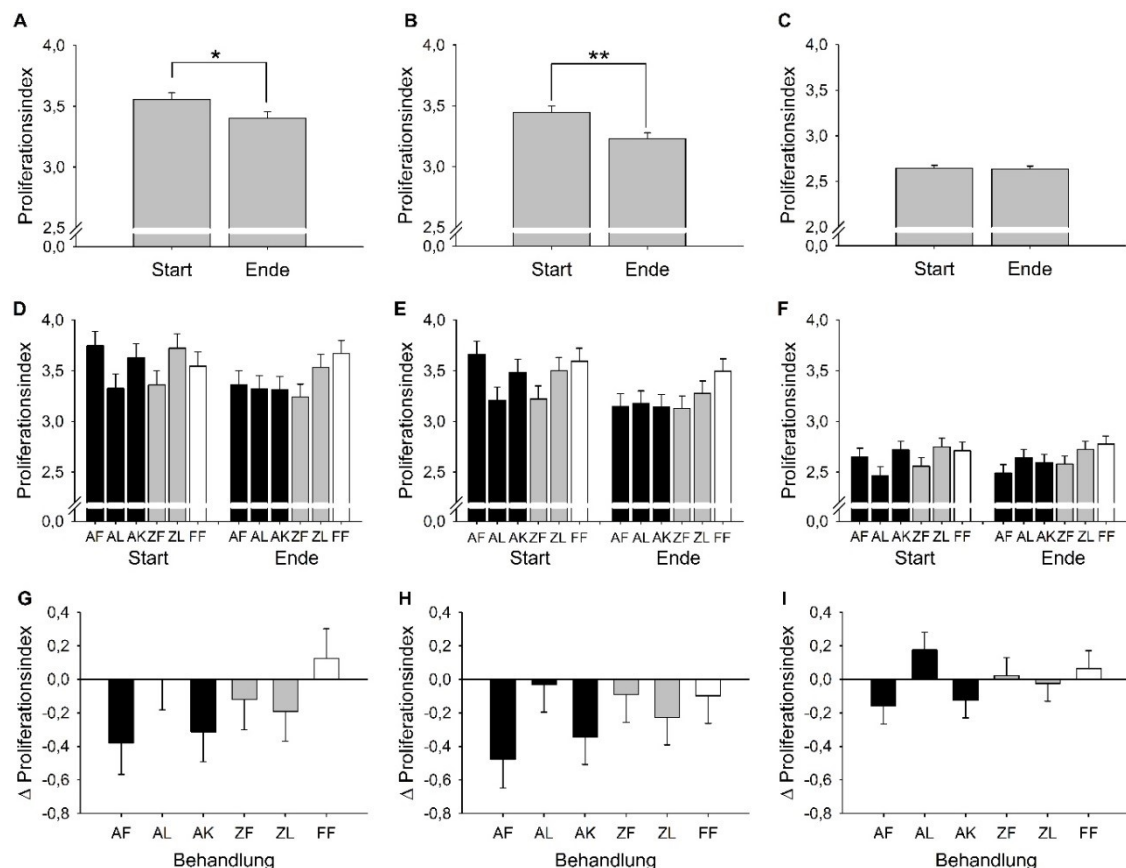
Der Faktor Durchgang hatte einen signifikanten Einfluss auf die erhobenen Parameter des Immunsystems (Tab. 3.7), außer auf die Zellzahl der Basophilen und der Eosinophilen. Die Faktoren Zeitpunkt und Behandlungen hatten keinen einheitlichen signifikanten Einfluss auf die Parameter des Immunsystems und werden daher separat in den folgenden Kapiteln ausgewertet.

**Tab. 3.7 Effekte des festen Faktors Durchgang auf die Parameter des Immunsystems.** Vollblutüberstand (VU), Zellkulturüberstand (ZKU).

Parameter			Durchgang
<b>Lymphozytenproliferation (s. Kap. 3.4.2)</b>			
	ConA		F = 9,11; p < 0,001
	PHA		F = 11,10; p < 0,001
	SEB		F = 11,25; p < 0,001
<b>Immunglobuline (s. Kap. 3.4.3)</b>			
	IgA		F = 14,72; p < 0,001
	IgG		F = 11,82; p < 0,001
	IgM		F = 15,34; p < 0,001
<b>Zytokine (s. Kap. 3.4.4)</b>			
ZKU	IL-4	ConA	F = 4,04; p < 0,01
		PHA	F = 5,89; p < 0,001
		SEB	F = 24,96; p < 0,01
	IL-10	ConA	F = 3,59; p < 0,001
		PHA	F = 3,69; p < 0,001
		SEB	F = 6,11; p < 0,001
VU	IL-10	LPS	F = 1,90; p < 0,05
	TNF- $\alpha$	LPS	F = 4,00; p < 0,001
<b>NK-Zellen (s. Kap. 3.4.5)</b>			F = 28,33; p < 0,001
<b>Differentialblutbild (s. Kap. 3.4.6)</b>			
	Basophile		F = 1,20; p = 0,31
	Eosinophile		F = 1,67; p = 0,11
	Lymphozyten		F = 3,31; p < 0,01
	Monophile		F = 2,72; p < 0,01
	Neutrophile		F = 2,89; p < 0,01
	N/L		F = 2,89; p < 0,01
<b>Leukozytenzahl (s. Kap. 3.4.6)</b>			F = 2,52; p < 0,01

### 3.4.2 Lymphozytenproliferation

Zur Überprüfung der Proliferationsfähigkeit der PBMCs in den verschiedenen Behandlungsgruppen wurde der LTT genutzt und die Zellen mit den Mitogenen ConA, SEB oder PHA stimuliert. Der ermittelte PI zeigt die Vitalität und das Wachstum der Zellen an und somit auch indirekt, ob Zellen als Reaktion auf einen Stimulus proliferieren. Für die Auswertung standen Daten von 16 Durchgängen zur Verfügung. Die verschiedenen Behandlungen beeinflussten die Lymphozytenproliferation nicht signifikant. Unabhängig von den Behandlungsgruppen konnte ein signifikanter Haupteffekt des Zeitpunktes auf die Proliferation der Lymphozyten nach der Stimulation mit ConA ( $F_{1,75} = 4,35$ ;  $p < 0,05$ ) oder PHA ( $F_{1,75} = 10,38$ ;  $p < 0,01$ ) nachgewiesen werden. In beiden Fällen war die Lymphozytenproliferation zum Ende des Experiments (ConA:  $t_{75} = 2,09$ ;  $p < 0,05$ ; PHA:  $t_{75} = 3,22$ ;  $p < 0,01$ ) reduziert (Abb. 3.9 A-C).

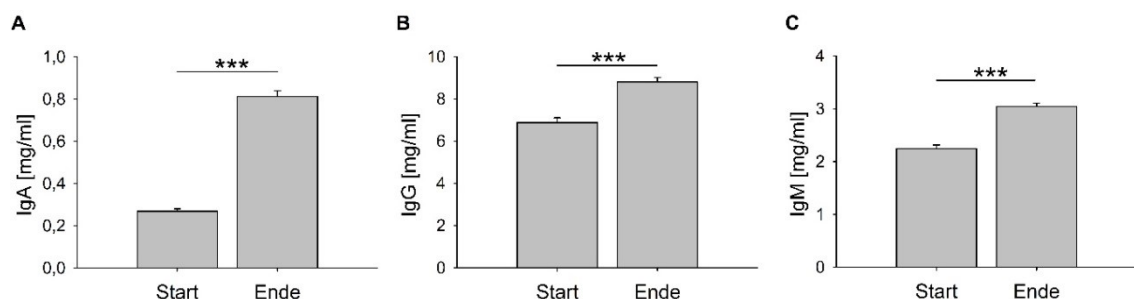


**Abb. 3.9 Lymphozytenproliferation der verschiedenen Behandlungsgruppen nach Mitogenzugabe.** A-F Dargestellt sind die Proliferationsindizes nach der Zugabe von ConA (A, D), PHA (B, E) und SEB (C, F) in A-C für alle Behandlungsgruppen zusammen sowie in D-F für die einzelnen Behandlungsgruppen (AF-Angekündigte Fütterung, AL-Angekündigter Luftstoß, AK-Angekündigter Konflikt, ZF-Zufällige Fütterung, ZL-Zufälliger Luftstoß, FF-Feste Fütterung). Die Proben wurden vier Tage vor dem Beginn (Start) und zum Ende des Experiments genommen G-I Die Differenzen der PI wurden aus dem PI zum Ende des Experiments minus dem PI vor dem Start des Experiments für die Stimulation mit ConA (G), PHA (H) und SEB (I) gebildet; Signifikante Unterschiede sind mit \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$  angegeben;  $n = 16$  pro Behandlung.

Die Stimulation mit SEB hatte keinen signifikanten Effekt auf die Zellproliferation (Abb. 3.9 A-C). Der Zeitpunkt innerhalb einer Behandlungsgruppe hatte keinen signifikanten Einfluss auf die mit ConA, PHA oder SEB stimulierte Lymphozytenproliferation (Abb. 3.9 D-E). Die Differenzen der PIs (Werte zu Beginn und zum Ende des Experiments) verdeutlichen zusätzlich, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen gab (Abb. 3.9 G-I).

### 3.4.3 Immunglobuline A, G und M

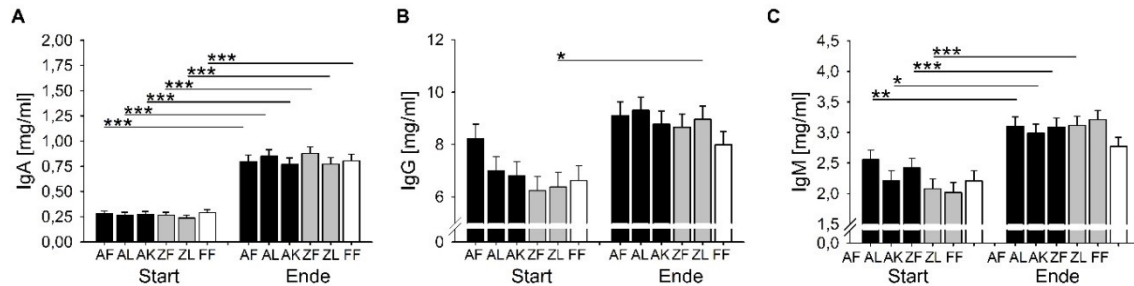
Zur Charakterisierung der humoralen Immunantwort wurden die Immunglobuline A, G und M im Blutplasma bestimmt. Für die Auswertung konnten die Daten von 16 Durchgängen verwendet werden. Die Konzentrationen von Ig A, G und M waren zum Ende des Experiments signifikant höher als zu Beginn (IgA:  $F_{1,75} = 546,13$ ;  $p < 0,001$ ; IgG:  $F_{1,75} = 51,12$ ;  $p < 0,001$ ; IgM:  $F_{1,75} = 105,60$ ;  $p < 0,001$ ; Abb. 3.10). Demnach wurde ein signifikanter Haupteffekt des Zeitpunkts bestimmt. Zum Versuchsbeginn gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.



**Abb. 3.10 Immunglobulinkonzentrationen zum Start und zum Ende des Experiments.** Dargestellt sind die IgA- (A), IgG- (B) und IgM-Konzentrationen (C) für alle Behandlungsgruppen zusammen vier Tage vor dem Start des Experiments (Start) und zum Ende des Experiments; Signifikante Unterschiede sind mit \*\*\*  $p < 0,001$  angegeben;  $n = 16$  pro Behandlung.

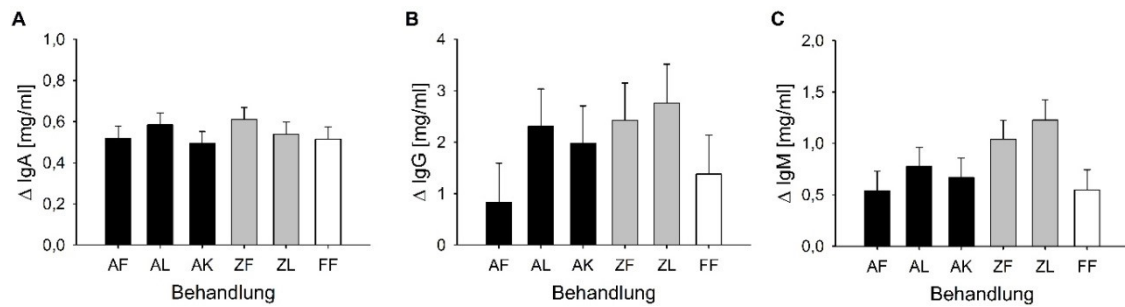
Die IgA-Konzentrationen stiegen signifikant in allen Behandlungsgruppen zum Versuchsende an ( $p < 0,001$ ; Abb. 3.11 A). Die IgG-Konzentrationen hingegen zeigten im Verlauf des Experiments nur in der ZL-Gruppe einen signifikanten Anstieg ( $t_{76} = -3,48$ ;  $p < 0,05$ ; Abb. 3.11 B). In den anderen Behandlungsgruppen war der Konzentrationsanstieg des IgGs nicht signifikant. Die IgM-Konzentrationen stiegen zum Ende des Experiments signifikant bei den Behandlungsgruppen AL, AK, ZF, und ZL (AL:  $t_{73} = -4,14$ ,  $p < 0,01$ ; AK:  $t_{73} = 3,57$ ,  $p < 0,05$ ;

ZF:  $t_{73} = -5,55$ ,  $p < 0,001$ ; ZL:  $t_{75} = -6,20$ ,  $p < 0,001$ ) und nicht signifikant bei den Gruppen AF und FF (Abb. 3.11 C). Zudem konnte ein tendenzieller Einfluss der Interaktion Behandlung x Zeitpunkt (Haupteffekt,  $F_{74,21} = 1,93$ ;  $p = 0,099$ ) für die IgM-Konzentrationen ermittelt werden. Diese Tendenz ist durch den signifikanten Effekt des Zeitpunktes innerhalb einer Behandlungsgruppe begründbar.



**Abb. 3.11 Ig-Konzentrationen der verschiedenen Behandlungsgruppen zum Start und zum Ende des Experiments.** Dargestellt sind die gemessenen IgA- (A), IgG- (B) und IgM-Konzentrationen (C) in den verschiedenen Behandlungsgruppen (AF-Angekündigte Fütterung, AL-Angekündigter Luftstoß, AK-Angekündigter Konflikt, ZF-Zufällige Fütterung, ZL-Zufälliger Luftstoß, FF-Feste Fütterung) vier Tage vor Beginn des Experiments (Start) und zum Ende des Experiments; Signifikante Unterschiede sind mit \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$  angegeben;  $n = 16$  pro Behandlung.

Die Differenzen der Immunglobulinkonzentrationen zu Beginn und zum Ende des Experiments zeigten, dass es zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede gab (Abb. 3.12). Nur für die Differenzen der IgM-Konzentrationen konnte eine Tendenz für den Einfluss des Faktors Behandlung (Haupteffekt) ermittelt werden ( $F_{5,71} = 2,20$ ;  $p < 0,1$ ). Numerisch auffällig, aber nicht signifikant, waren die Unterschiede für die Differenzen der IgM-Konzentrationen zwischen den Behandlungen AF und ZL sowie zwischen ZL und FF. Diese beruhten vermutlich auf den geringen Startkonzentrationen des IgMs in der Behandlungsgruppe ZL und dem zum Ende des Experiments folgenden starken Anstieg (Abb. 3.11 C). Für die Differenzen der IgA- und der IgM-Konzentrationen konnte ein signifikanter Durchgangseffekt ermittelt werden (IgA:  $F_{15,72} = 7,06$ ,  $p < 0,001$ ; IgM:  $F_{15,71} = 8,57$ ,  $p < 0,001$ ).



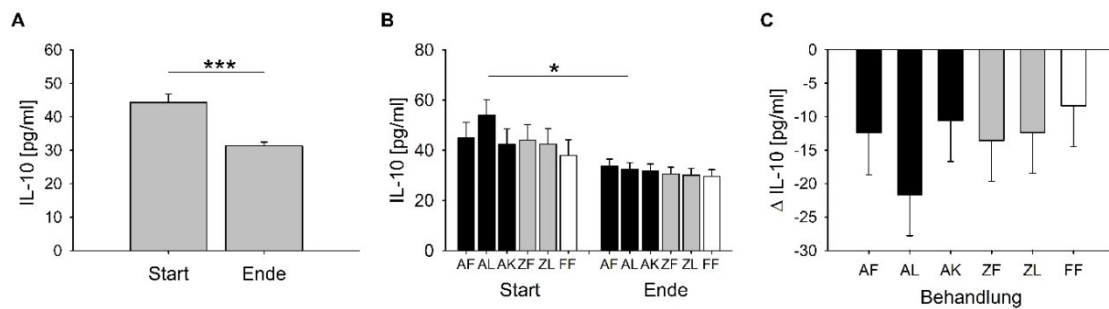
**Abb. 3.12 Differenzen der Ig-Konzentrationen der verschiedenen Behandlungsgruppen.** Die Differenzen der IgA- (A), der IgG- (B) und der IgM-Konzentrationen (C) der Behandlungsgruppen (AF-Angekündigte Fütterung, AL-Angekündigter Luftstoß, AK-Angekündigter Konflikt, ZF-Zufällige Fütterung, ZL-Zufälliger Luftstoß, FF-Feste Fütterung) ergeben sich aus den Ig-Werten zum Ende des Experiments minus der Ig-Werte zum Start (vier Tage vor dem Start des Experiments); keine signifikante Unterschiede; n = 16 pro Behandlung.

### 3.4.4 Zytokine

Es wurde geprüft, ob die verschiedenen Behandlungen einen Einfluss auf die Mitogen- bzw. LPS-induzierte Zytokinproduktion hatten. Zur Kontrolle wurden Ansätze ohne LPS oder Mitogen mitgeführt. Die anti- und proinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  wurden in Zellkulturüberständen oder im Vollblut bestimmt.

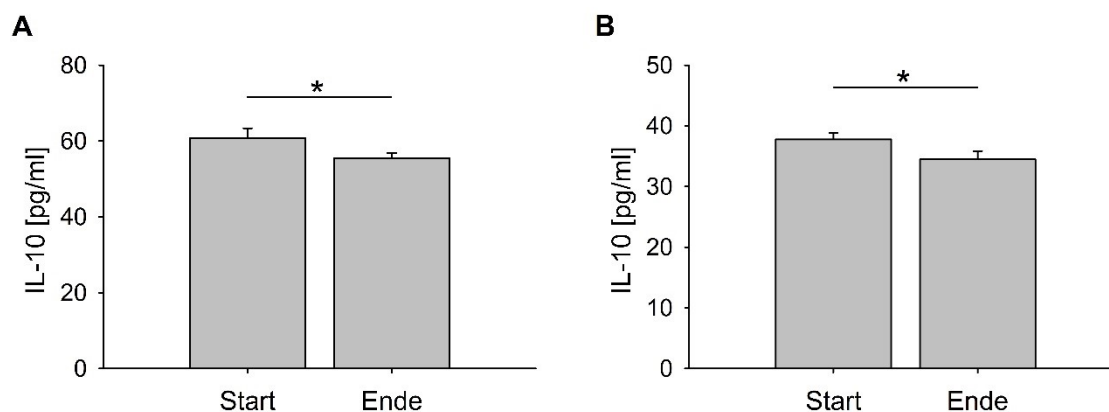
**IL-4.** Die im Zellkulturüberstand nach Mitogenstimulation (ConA, PHA) gemessenen IL-4-Konzentrationen (n = 7) stiegen im Verlauf des Experiments nicht an. Der signifikante Einfluss des Durchgangs konnte auch für die Differenzwerte bestimmt werden ( $F_{30} = 2,57$ ;  $p < 0,05$ ). Die Behandlungen zeigten keine signifikanten Effekte auf die IL-4-Produktion nach Mitogenstimulation. Nach der Stimulation mit SEB lagen die gemessenen IL-4-Konzentrationen ebenso wie die Kontrolle (unstimuliert) unterhalb der Detektionsgrenze, sodass nach zwei bzw. drei Durchgängen die Messungen abgebrochen wurden.

**IL-10.** Für alle IL-10-Analysen konnten die Daten von 16 Durchgängen verwendet werden. Das mit LPS-stimulierte Vollblut zeigte in allen Behandlungsgruppen am Ende des Experiments geringere IL-10-Konzentrationen im Vergleich zum Start ( $F_{1,75} = 27,03$ ;  $p < 0,001$ ). Im paarweisen Vergleich der Zeitpunkte gab es bis auf die Behandlung AL ( $t_{75} = 3,56$ ;  $p < 0,05$ ) keine signifikanten Unterschiede. Dies konnte durch die Differenzberechnungen (End- minus Startwerte) bestätigt werden (Abb. 3.13). Die unstimulierten Vollblutproben enthielten IL-10-Konzentrationen unterhalb der Detektionsgrenze.



**Abb. 3.13 IL-10-Konzentration im Vollblutüberstand.** Gemessene IL-10-Konzentrationen im Vollblutüberstand nach der LPS-Stimulation für alle Behandlungen (AF-Angekündigte Fütterung, AL-Angekündigter Luftstoß, AK-Angekündigter Konflikt, ZF-Zufällige Fütterung, ZL-Zufälliger Luftstoß, FF-Feste Fütterung) zusammen (A) und für die einzelnen Behandlungen (B) zum Start (vier Tage vor Versuchsbeginn) und zum Ende des Experiments. C Differenzen der IL10-Konzentrationen (End- minus Startwerte) für die verschiedenen Behandlungsgruppen. Signifikante Unterschiede sind mit \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*  $p < 0,05$  angegeben;  $n = 16$  pro Behandlung.

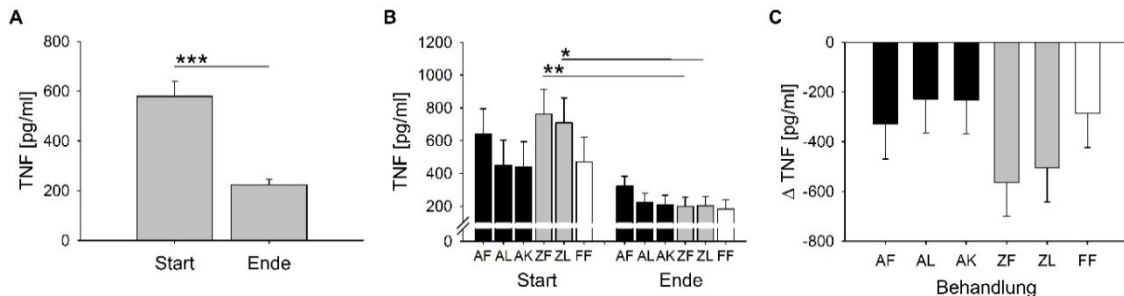
Die IL-10-Konzentrationen in den Mitogen-stimulierten Zellkulturüberständen wurden von den verschiedenen Behandlungen nicht signifikant beeinflusst. Dennoch konnte ein signifikanter Haupteffekt des Zeitpunktes für die Stimulation mit ConA ( $F_{1,75} = 4,15$   $p < 0,05$ ) und SEB ( $F_{1,75} = 5,4$ ;  $p < 0,05$ ) nachgewiesen werden, wonach die IL-10-Konzentrationen am Ende des Experiments signifikant niedriger als zu Beginn waren (Abb. 3.14). Die IL-10-Produktion nach PHA-Stimulation wurde nicht signifikant beeinflusst. Die Zellkulturüberstände, die nicht stimuliert wurden, wiesen IL-10-Konzentrationen unterhalb der Detektionsgrenze auf.



**Abb. 3.14 IL-10-Konzentration im Zellkulturüberstand.** Einfluss des Zeitpunkts (Start (vier Tage vor Versuchsbeginn) und Ende des Experiments) auf die IL-10-Konzentration in allen Behandlungsgruppen nach der Stimulation mit ConA (A) und SEB (B); Signifikante Unterschiede sind mit \*  $p < 0,05$  angegeben;  $n = 16$  pro Behandlung.

**IFN- $\gamma$ .** Die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen lagen unterhalb der Detektionsgrenze und wurden nach drei Durchgängen nicht mehr analysiert.

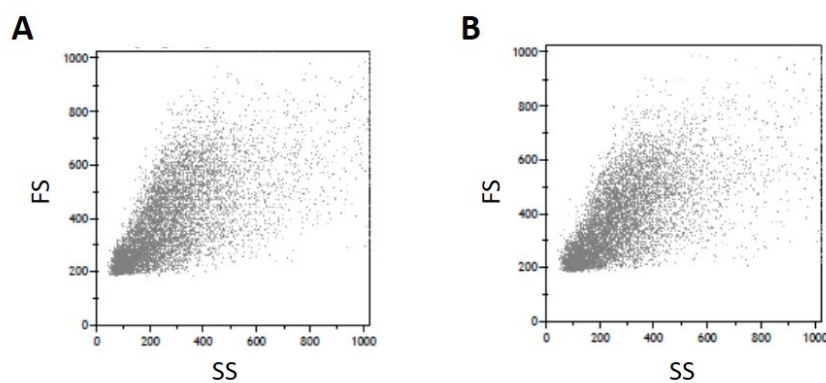
**TNF- $\alpha$ .** Die Daten von 16 Durchgängen konnten für die Auswertung genutzt werden. Die Untersuchungen der Vollblutproben nach der LPS-Stimulation hinsichtlich der TNF- $\alpha$ -Konzentrationen zeigten einen signifikanten Haupteffekt des Zeitpunktes unabhängig von der Behandlungsgruppe. Demnach waren die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen zu Beginn des Experiments höher als im Vergleich zum Ende ( $F_{1,149} = 41,27$ ;  $p < 0,001$ ). Im paarweisen Vergleich waren die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen zum Ende des Versuches bei den Tieren der Behandlungsgruppen ZF ( $t_{149} = 4,16$ ;  $p < 0,001$ ) und ZL ( $t_{149} = 3,73$ ;  $p < 0,05$ ) im Vergleich zu den Startkonzentrationen signifikant niedriger (Abb. 3.15). Die restlichen Behandlungsgruppen zeigten ebenfalls geringere Konzentrationen am Versuchsende, diese waren jedoch nicht signifikant. Die Betrachtung der Differenzen von End- und Startwerten zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen, lediglich der Faktor Durchgang hatte einen signifikanten Einfluss ( $F_{15,74} = 3,67$ ;  $p < 0,001$ ). In den unstimulierten Vollblutüberständen lagen die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen unterhalb der Detektionsgrenze.



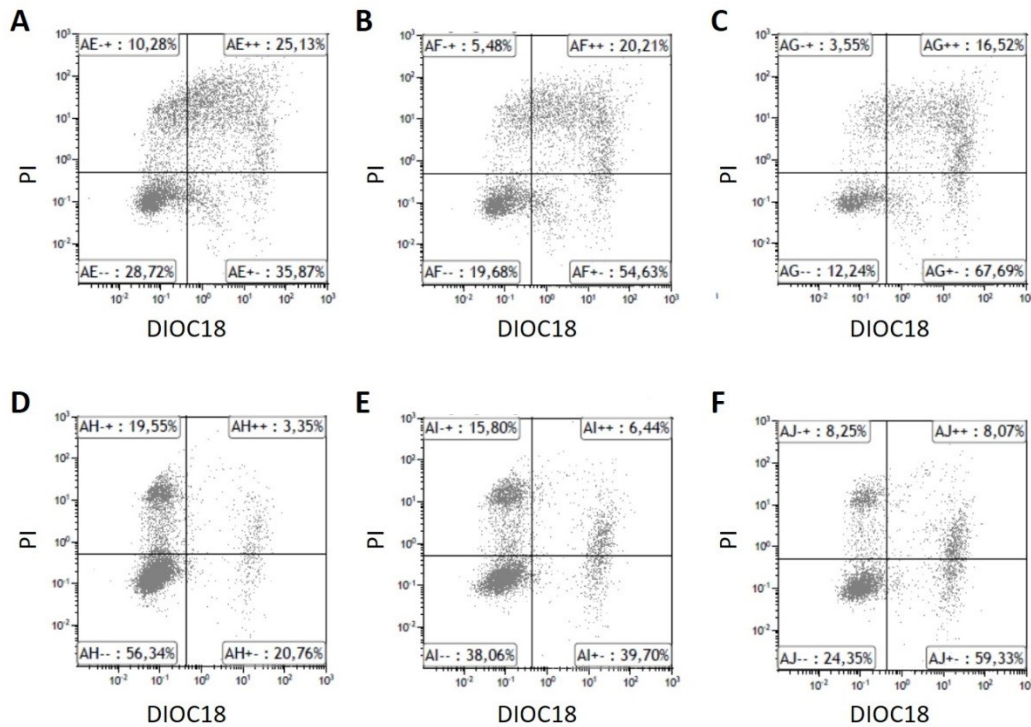
**Abb. 3.15 TNF- $\alpha$ -Konzentration im Vollblutüberstand.** Gemessene TNF- $\alpha$ -Konzentrationen im Vollblutüberstand nach der LPS-Stimulation für alle Behandlungen (AF-Angekündigte Fütterung, AL-Angekündigter Luftstoß, AK-Angekündigter Konflikt, ZF-Zufällige Fütterung, ZL-Zufälliger Luftstoß, FF-Feste Fütterung) zusammen (A) und für die einzelnen Behandlungen (B) zum Start (vier Tage vor Versuchsbeginn) und zum Ende des Experiments. C Differenzen der TNF $\alpha$ -Konzentrationen (End- minus Startwerte) für die verschiedenen Behandlungsgruppen. Signifikante Unterschiede sind mit \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$  angegeben;  $n = 16$  pro Behandlung.

### 3.4.5 NK-Zell-Assay

Als Teil des angeborenen Immunsystems wurde die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen ermittelt. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Identifizierung und Quantifizierung der NK-Effektor- und der K562-Zielzellen ist hier beispielhaft anhand der Behandlungsgruppe FF (Feste Fütterung) in Durchgang 15 dargestellt (Abb. 3.16, Abb. 3.17). Zunächst wurden die Zellgröße und -granularität mittels der Messung des Vorwärts- (FS, *forward scatter*) sowie des Seitwärtsstreulicht (SS, *side scatter*) als ein Identifizierungsmerkmal ermittelt (Abb. 3.16). Anschließend wurde die zellspezifische Doppelfluoreszenz gemessen und quantifiziert (Abb. 3.17) und darüber die Zytotoxizität der NK-Zellen ermittelt. Für die Auswertung konnten die Daten von zehn Durchgängen genutzt werden.

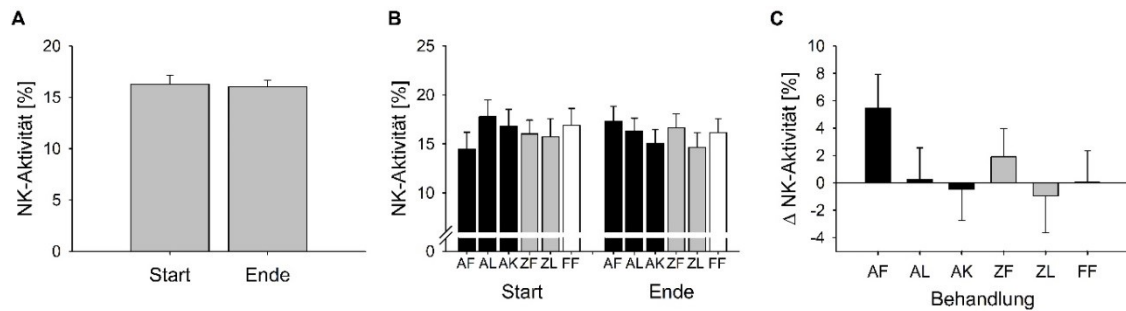


**Abb. 3.16** Beispielhafte Histogramm für die Zellgranularität und -größe zur Identifizierung der Zellen im NK-Zell-Assay für die Behandlungsgruppe FF. A-B Histogramme zur Erfassung der Zellgröße (FS, *forward scatter*) sowie der Zellgranularität (SS, *side scatter*) im NK-Zell-Assay für die Behandlungsgruppe FF in A zu Beginn und in B zum Ende des Experiments.



**Abb. 3.17** Beispielhafte Histogramme des Zytotoxizitätstests und der Niedrigkontrolle des NK-Zell-Assays zu Beginn des Versuchs für die Behandlungsgruppe FF. Beispielhafte Darstellung für die durchflusszytometrische Quantifizierung von NK-Effektor- und K562-Zielzellen (Behandlung FF (Feste Fütterung) in Durchgang 15) zu Beginn des Versuchs (d0). Die Analyse der Fluoreszenz erfolgte jeweils für DiOC18 (grüne Fluoreszenz) und für PI (rote Fluoreszenzintensität). Gezeigt sind die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests (A-C) und dessen Niedrigkontrolle (D-F) für die 80:1 (A, D), 40:1 (B, E) und 20:1 (C, F) Verdünnungen des Effektor-Zielzellgemisches.

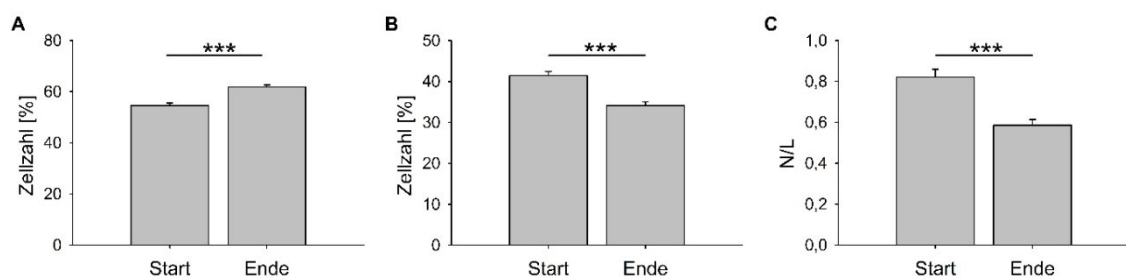
Die Aktivität der NK-Zellen wurde nicht signifikant durch die Behandlungen beeinflusst. Es gab keine Aktivitätsunterschiede zwischen den unterschiedlichen Behandlungsgruppen, dies konnte auch durch die Differenzberechnungen (Ende minus Start) bestätigt werden (Abb. 3.18). Der Zeitpunkt, Start und Ende des Experiments, hatte keinen Einfluss auf die NK-Zellen. Die berechneten Differenzen der NK-Zytotoxizität wurden signifikant durch den Faktor Durchgang beeinflusst ( $F_{8,32} = 9,99$ ;  $p < 0,001$ ).



**Abb. 3.18 Ergebnisse des NK-Zell-Assays.** Die Aktivität der NK-Zellen wurde für alle Behandlungsgruppen (AF-Angekündigte Fütterung, AL-Angekündigter Luftstoß, AK-Angekündigter Konflikt, ZF-Zufällige Fütterung, ZL-Zufälliger Luftstoß, FF-Feste Fütterung) zusammen (**A**) und für die verschiedenen Behandlungen einzeln (**B**) zum Start und zum Ende des Versuchs dargestellt. **C** Die Differenzen der NK-Aktivität (End- minus Startwerte) wurden für die einzelnen Behandlungen ermittelt; keine signifikanten Unterschiede; n = 10 pro Behandlung.

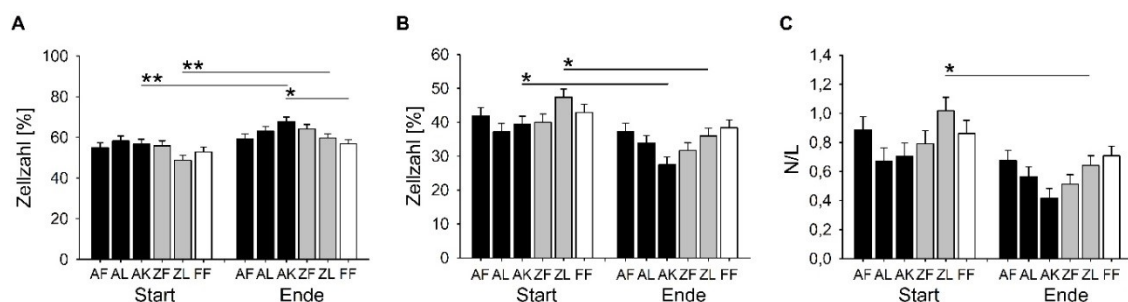
### 3.4.6 Differentialblutbild

Die experimentellen Behandlungen innerhalb der verwendeten elf Durchgänge hatten keinen signifikanten Effekt auf die Zellzahlen von Basophilen, Eosinophilen und Monozyten. Die Zellzahlen der Lymphozyten (L) und Neutrophilen (N) sowie das Verhältnis beider zueinander (N/L) wurden signifikant durch den Haupteffekt Behandlung (L:  $F_{5,50} = 3,08$ ;  $p < 0,05$ ; N:  $F_{5,50} = 2,92$ ;  $p < 0,05$ ; N/L:  $F_{5,50} = 2,94$ ;  $p < 0,05$ ) und Zeitpunkt (L:  $F_{1,50} = 40,36$ ;  $p < 0,001$ ; N:  $F_{1,50} = 41,64$ ;  $p < 0,001$ ; N/L:  $F_{1,50} = 34,49$ ;  $p < 0,001$ ) beeinflusst. Dabei stieg die Anzahl der Lymphozyten ( $t_{50} = -6,35$ ;  $p < 0,001$ ) zum Ende des Experiments bei allen Behandlungsgruppen, im Gegensatz dazu sank die Anzahl der Neutrophilen ( $t_{49} = 4,13$ ;  $p < 0,01$ ) zum Ende hin (Abb. 3.19). Daraus resultierend sank auch das N/L Verhältnis signifikant ( $t_{49} = 3,85$ ;  $p < 0,001$ ).



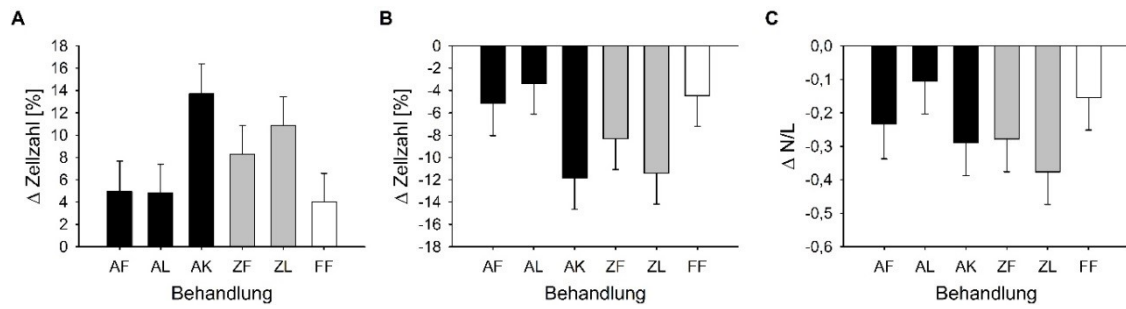
**Abb. 3.19 Anteil Lymphozyten und Neutrophile für alle Behandlungsgruppen zusammen.** Zellzahlen der Lymphozyten (**A**, L) und der Neutrophilen (**B**, N) und das Verhältnis N/L (**C**) 4 Tage vor dem Beginn des Experiments (Start) und zum Ende des Experiments; Signifikante Unterschiede sind mit \*\*\*  $p < 0,001$  angegeben; n = 11 pro Behandlung.

Für die Behandlungen AK ( $t_{49} = -3,99$ ;  $p < 0,001$ ) und ZL ( $t_{49} = -3,93$ ;  $p < 0,001$ ) konnte ein signifikanter Anstieg der Lymphozytenzahlen zum Ende des Experiments (Abb. 3.20) gezeigt werden. Die Anzahl der Lymphozyten der AK-Tiere war am Ende des Experiments signifikant höher als die der FF-Tiere ( $t_{49} = 3,47$ ;  $p < 0,01$ ). Für die Behandlungen AK ( $t_{49} = 4,29$ ;  $p < 0,01$ ) und ZL ( $t_{49} = 4,13$ ;  $p < 0,01$ ) konnte zudem eine signifikante Abnahme der Neutrophilenzahl zum Versuchsende nachgewiesen werden. Das N/L-Verhältnis war zum Ende des Experiments ebenfalls signifikant kleiner als zu Beginn, jedoch nur bei den ZL-Tieren ( $t_{49} = 3,85$ ;  $p < 0,01$ ).



**Abb. 3.20 Anteil Lymphozyten und Neutrophile für die jeweilige Behandlungsgruppe.** Zellzahlen der Lymphozyten (A, L) und der Neutrophilen (B, N) sowie das Verhältnis von N/L (C) 4Tage vor dem Beginn des Experiments (Start) und zum Ende des Experiments für die verschiedenen Behandlungen (AF-Angekündigte Fütterung, AL-Angekündigter Luftstoß, AK-Angekündigter Konflikt, ZF-Zufällige Fütterung, ZL-Zufälliger Luftstoß, FF-Feste Fütterung); Signifikante Unterschiede sind mit \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$  angegeben;  $n = 11$  pro Behandlung.

Betrachtet man die Ergebnisse der Differenzberechnungen (End- minus Startwerte), zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Abb. 3.21). Lediglich die Differenzen der Lymphozytenzahlen zeigten einen tendenziellen Einfluss des Faktors Behandlung ( $F_{5,48} = 2,86$ ;  $p < 0,1$ ) sowie signifikante Effekte des Faktors Durchgang auf die Anzahl der Lymphozyten ( $F_{10,48} = 3,85$ ;  $p < 0,001$ ), der Neutrophilen ( $F_{10,49} = 2,52$ ;  $p < 0,05$ ) und der Eosinophilen ( $F_{10,49} = 2,84$ ;  $p < 0,01$ ) sowie auf das Verhältnis von N zu L ( $F_{10,49} = 2,58$ ;  $p < 0,05$ ). Der tendenzielle Einfluss des Faktors Behandlung auf die Differenzen der Lymphozytenzahlen konnte für die einzelnen Behandlungsgruppen nicht bestätigt werden. Es konnte lediglich ein numerisch auffälliger, jedoch nicht signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen AK und FF ermittelt werden ( $t_{48} = 2,59$ ;  $p = 0,12$ ).



**Abb. 3.21 Differenzen der Anteile an Lymphozyten und Neutrophilen für die jeweiligen Behandlungsgruppen.** Differenz (End- minus Startwerte) der Zellzahlen für die Lymphozyten (**A**, L) und Neutrophilen (**B**, N) sowie für das Verhältnis von N/L (**C**) für die verschiedenen Behandlungsgruppen (AF-Angekündigte Fütterung, AL-Angekündigter Luftstoß, AK-Angekündigter Konflikt, ZF-Zufällige Fütterung, ZL-Zufälliger Luftstoß, FF-Feste Fütterung); keine signifikanten Unterschiede;  $n = 11$  pro Behandlung.

## 4. Diskussion

---

### 4.1 Allgemein

---

Diese Studie untersucht erstmalig den Einfluss von antizipationsbedingten Stimmungen auf die neuroendokrine Modulation des Immunsystems beim Hausschwein. Die Tiere wurden je nach Behandlungsgruppe mit wiederholten unangekündigten oder angekündigten (akust. Signal) positiven (AF, ZF), negativen (AL, ZL) oder ambivalenten Stimuli (AK) gereizt. Über den Aufbau einer passiven Erwartungshaltung (Antizipation) sollte bei den konditionierten Tieren langfristig Stimmungen entsprechend der Valenz des verwendeten Stimulus induziert werden. Die Erfassung von immunologischen und neuroendokrinen Parametern sollte Aufschluss über die Effekte der induzierten Stimmungen auf die Immunkompetenz geben. Ein besseres Verständnis der tierseitigen Bewertung eröffnet neue Möglichkeiten, das Wohlbefinden der Tiere über die entsprechende Anpassung der Haltungsumwelt zu verbessern.

### 4.2 Versuchsdesign

---

Die von uns ausgewählten Stimuli sollten positive, negative oder ambivalente Emotionen erzeugen, die langfristig zu Stimmungsänderungen führen (Boissy, 2007). Als positiver Stimulus wurde bewusst das in der Schweinezucht verwendete Standardfutter verwendet, um den garantierten Verzehr durch alle Tiere zu gewährleisten. Zudem ist Futter an sich als essentielle Ressource biologisch relevant für das Überleben der Tiere, sodass eine über den ganzen Versuch andauernde Motivation zur Futteraufnahme gegeben war. Die Fütterung über einen elektronischen Futterautomaten ermöglichte die zeitgleiche Futterabgabe für verschiedene Behandlungsgruppen (AF, AK).

Der ausgewählte Aversivreiz musste mehrere Anforderungen erfüllen. Zum einen sollte er innerhalb der experimentellen Prozedur automatisierbar sein und zum anderen die Erhebung aller Messparameter ermöglichen. Die Gabe von Elektroschocks als Aversivreiz, wie bei Döpjan et al. (2008) beschrieben, konnte aufgrund der parallel laufenden Herzfrequenzmessungen an den Versuchstieren nicht eingesetzt werden (Mahnhardt, 2015). Die Verwendung von Wasser als mildem aversiven Stimulus wurde bereits durch Hutson et al. (1993) bei Schweinen und durch Ward et al. (2008) beim Waschbären getestet. Die Reizung mit einem Wasserstrahl kann

jedoch die Infektanfälligkeit bei den Versuchstieren erhöhen, insbesondere da die Tiere bereits starken Stressoren ausgesetzt waren. Zu diesen Stressoren zählte das Absetzen vom Muttertier, die darauf folgende Umstellung auf Pelletfutter sowie die experimentell bedingte Umstellung ins Tiertechnikum, wo aufgrund der Einzelhaltung ein gegenseitiges Wärmen nicht möglich war. Die aversive Reizung durch Wedeln und Rascheln mit einer Plastiktüte wurde von Douglas et al. (2012) erfolgreich verwendet. Da dieser Aversivreiz jedoch nicht automatisierbar ist und zudem nicht gezielt nur das gewünschte Tier trifft, wurde er von uns nicht eingesetzt. Die Reizung mit einem kräftigen Luftstoß hingegen, ein etablierter Aversivreiz (Meagher et al., 2012: Nerz; Huot et al., 2002: Ratten; Lansade und Simon, 2010: Pferde), eignete sich für den experimentellen Aufbau und Ablauf dieser Studie am besten und wurde daher von uns bevorzugt. Der Luftstoß war automatisierbar, traf nur das gewünschte Tier und war zudem nicht mit einem erhöhten Infektionsrisiko verbunden.

Als ambivalenter Reiz wurde der Wechsel von Futter und Luftstoß gewählt. Die Tiere standen in Konflikt, ob nach dem akustischen Signal der positive oder der negative Stimulus erfolgte. Durch das Ausbleiben von Futter (positiver Stimulus) sollte Frustration auftreten.

Alle Tiere wurden in Einzelbuchten und während des Experiments restriktiv gehalten. Nur so konnten die kardiologischen Untersuchungen sowie die Luftstoßbehandlungen durchgeführt werden und eine vergleichbare experimentelle Situation für alle Behandlungsgruppen garantiert werden. Die Tiere hatten akustischen, olfaktorischen und eingeschränkten taktilen Kontakt zueinander. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die Tiere sich an die Restriktionshaltung gewöhnen, sodass eine emotionale Beeinträchtigung der Tiere nicht anzunehmen war. Die Gruppenhaltung per se wäre vermutlich besser geeignet, um positive Stimmungen zu induzieren. Bei Ratten konnte bereits ein Einfluss der Haltungsbedingungen auf die Glucocorticoidkonzentrationen gezeigt werden (Stefanski et al., 2001 (Kolonie- oder Paarhaltung), 2005 (Einzelhaltung oder Haltung mit wiederholtem sozialem Stress)). Für trächtige Sauen wurde ebenfalls ein Einfluss des Haltungssystems (Gruppen- oder Einzelhaltung) auf die adaptive Immunantwort nachgewiesen (Grün et al., 2014). Die Gruppenhaltung war im Rahmen dieser Studie aufgrund der gezielten Anwendung des Aversivreizes, des Futters sowie der Herzfrequenzgurte nicht möglich. Bei der Verwendung eines eigenen Versuchsraumes für jede Behandlungsgruppe wären mehrere Tiere pro Behandlungsgruppe und somit eine Gruppenhaltung denkbar. Die Herzfrequenzgurte könnten nach neuestem Erkenntnisstand mit zusätzlichen Gurten fixiert werden, sodass diese nicht durch andere Tiere entfernt werden. Es kämen dann auch Negativreize wie die Vibration mittels Bodenplatten (Manteuffel et al., 2014) oder das Erschrecken mit einem raschelndem

Gegenstand, z.B. einer Plastiktüte (Douglas et al., 2012), in Betracht. Innerhalb der Einzelhaltung wäre die Kombination von Vibration und Luftstoß oder Elektroschocks (dann ohne Herzfrequenzmessung) denkbar.

### 4.3 Effekte auf die Parameter der HPA-Achse

---

Die Vorhersehbarkeit eines Reizes, sei er von positiver oder negativer Natur, ist entscheidend für die Wahrnehmung durch das Tier. Ist ein aversiver Reiz vorhersehbar, kann dieser von einem starken zu einem mittleren aversiven Reiz werden, selbst wenn dieser in seiner Dauer länger und der Intensität stärker ist als ein nicht vorhersehbarer Stimulus (Basset und Buchanan, 2007). Es herrscht jedoch keine Einigkeit in Bezug auf den Einfluss der Vorhersehbarkeit und des daraufhin folgenden Stressempfindens. Einerseits zeigen Studien an Ratten, dass eine physiologische Stressantwort durch einen elektrischen Schock ausgelöst wird, der zuvor nicht angekündigt und zeitlich unvorhersehbar ist. Infolge der Aktivierung der HPA-Achse konnten so beispielsweise erhöhte Plasmacortisolwerte nachgewiesen werden (Seligman und Meyer, 1970). Andererseits zeigten andere experimentelle Untersuchungen bei Ratten, dass durch die Vorhersehbarkeit des aversiven elektrischen Fuss-Schocks eine stärkere aversive Wirkung nachweisbar ist, als bei einem vergleichbaren physiologischen Stresssignal (Weinberg und Levine, 1980). Eine Untersuchung bei Totenkopffäffchen ergab zudem, dass eine stärkere physiologische und verhaltensauffällige Stressantwort nach der Separation vom Muttertier bei bekannter Dauer im Vergleich zur unbestimmten Dauer auftritt (Jordan et al., 1984). Offenbar ist neben der Vorhersehbarkeit auch die Intensität des aversiven Reizes für die Aktivierung der HPA-Achse entscheidend.

Innerhalb unserer Studie konnten die Tiere der Behandlungsgruppe AL im Gegensatz zur Gruppe ZL einen negativen Stimulus antizipieren. Die durch den angekündigten aversiven Stimulus bewirkte Initiierung der physiologischen Stressreaktion sollte durch den Aufbau einer Erwartungshaltung stärker ausfallen als bei den Tieren ohne Ankündigung (ZL). Es konnte jedoch, entgegen unseren Erwartungen, weder für die negativ antizipierenden Tiere eine erhöhte und noch für die positiv antizipierenden Tiere eine gesenkte HPA-Antwort gezeigt werden.

Die angekündigt aversiv behandelten Tiere zeigten keine antizipationsinduzierten Unterschiede in den Herz- und Verhaltensreaktionen. Durch das Tonsignal wurde der Aversivreiz für die Tiere vorhersehbar und offenbar in seiner Intensität abgeschwächt (Mahnhardt, 2015). Die Verhaltensreaktionen der Gruppen mit Luftstoßreizung (AL, AK, ZL) lassen auf eine Habituation an den Aversivreiz schließen und zeigten einen Wechsel von aktivem zu passivem *Coping*. Für die positiv gereizten Tiere (AF, AK) konnte während der Antizipation (Tonsignal) eine positive emotionale Reizung anhand der Verhaltens- und Herzreaktionen gezeigt werden. Die erwartete altersabhängige Abnahme der Basalherzfrequenz blieb jedoch für die positiv gereizten Tiere (AF, AK, ZL) aus. Vermutlich waren diese Tiere aufgrund der ständigen Erwartung von Futter dauererregt, was die Verschiebung des autonomen Gleichgewichts in Richtung Sympathikus zur Folge hatte. Diese Verschiebung war in allen Behandlungsgruppen zu beobachten und deutet auf eine negative Belastung der Tiere in Bezug auf das experimentelle Design hin (Mahnhardt, 2015).

Zu Beginn des Versuches konnten behandlungsunabhängige, signifikant erhöhte ACTH-Werte festgestellt werden. Die Ausschüttung des ACTHs ist eine Folge der aktivierten HPA-Achse und zieht die Freisetzung von Cortisol aus der Nebennierenrinde nach sich. In unserem Versuch waren die Cortisolwerte im Speichel zu Beginn und während des *Handlings* bei allen Behandlungsgruppen signifikant erhöht. Die Konzentrationserhöhung von ACTH und Speichelcortisol in allen Behandlungsgruppen zu Beginn des Versuches zeigt, dass die Tiere sich zunächst an die experimentelle Prozedur und die beteiligten Personen gewöhnen mussten. Nach der erfolgten Habituation innerhalb der ersten Tage und Wochen sanken sowohl die ACTH- als auch die Speichelcortisolwerte wieder auf ein basales Niveau. Die Habituation an einen wiederholten Stressor ist charakteristisch für die HPA-Achse und wurde bereits mehrfach für Tiere und Menschen beschrieben (Wüst et al., 2005; Gianferante et al., 2014; Meyer et al., 2015).

Studien konnten belegen, dass die Cortisolkonzentrationen im Speichel und im Plasma korrelieren (Gozansky et al., 2005; Calixto et al., 2002). Unsere Tiere zeigten jedoch nicht, wie ursprünglich erwartet, einen ähnlichen Verlauf der Cortisolkonzentrationen im Plasma und im Speichel. Da die Speichelentnahme eine nicht-invasive Messmethode ist, konnten im Vergleich zur Plasmabestimmung mehr Messwerte an verschiedenen Tagen aufgenommen und zusätzlicher Stress durch die Entnahme vermieden werden. Aufgrund der erhöhten Stichprobenzahl konnte eine statistisch sichere Bestimmung des Cortisolverlaufs im Speichel innerhalb des Versuchs ermöglicht werden. Daher sind diese Werte denen der Plasmaanalyse zu bevorzugen. Cook et al. (1996) bezeichnete die Bestimmung der Cortisolwerte innerhalb des

Speichels im Vergleich zum Plasma als biologisch bedeutender, da diese den biologisch aktiven und somit freien Anteil an Cortisol repräsentieren. Im Blutplasma hingegen liegt neben dem freien Cortisol auch die gebundene Form vor. Über 90 % der im Blut vorkommenden GCs werden über das Corticosteroid-bindende Globulin (CBG) gebunden und sind somit nicht aktiv (Lewis et al., 2005). Über die Stressreaktion wird die Freisetzung des Cortisols ins Blut reguliert und der Anteil an CBG sinkt im Verhältnis dazu. Da bei der Bestimmung des Cortisols im Plasma die Verteilung von freiem und gebundenem Cortisol berücksichtigt werden muss, sehen Gozansky und Kollegen (2005) klar den Vorteil in der Erfassung des Cortisols im Speichel. Zudem konnte beim Menschen ebenfalls ein verstärkter signifikanter Anstieg des Speichelcortisols im Vergleich zum Plasmacortisol nach der Gabe von CRH oder nach Sportübungen beobachtet werden. Aardal-Eriksson et al. (1998) konnten ebenso eine verstärkte Cortisolantwort im Speichel im Vergleich zum Plasma feststellen und schlagen die Bestimmung des Cortisols im Speichel als einen geeigneten alternativen Parameter für dynamische endokrine Tests vor.

Über einen negativen Rückkopplungsprozess können die GCs über die Bindung an MRs und GRs an die cerebralen Strukturen Hippocampus, Hypothalamus und Hypophyse die Stressantwort regulieren und beenden. Folglich wird die CRH-Ausschüttung gehemmt und somit auch die Expression der CRH-Rezeptoren. CRH wird als Initiator der HPA-Antwort vor allem im PVN exprimiert, zudem aber auch in Gehirnbereichen wie der Amygdala, dem frontalen Cortex, dem Cerebellum und anderen (Swanson et al., 1983) sowie in peripheren Organen wie Nebenniere, Herz, Lunge und anderen (Ableitner, 2009). CRH hat neben seiner endokrinen Funktion auch physiologische und neuromodulatorische, die unter anderem Kognition, Motivation und Emotionen beeinflussen können (Bale und Vale, 2004). Die mRNA von CRH wurde von uns in den Hirnregionen Amygdala und Hypothalamus für die verschiedenen Behandlungsgruppen überprüft. Es war anzunehmen, dass die mRNA-Konzentrationen des CRHs bei induziertem Stress bzw. negativer oder auch ambivalenter Stimmung erhöht sind. Dies konnte für unsere Tiere nicht nachgewiesen werden. Die verschiedenen Behandlungsgruppen unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich der mRNA-Konzentrationen des CRHs. Dies stützt die Annahme, dass die Tiere an die experimentelle Prozedur habituierten und der aversive sowie der ambivalente Reiz in ihrer Intensität nicht stark genug waren, um langfristig eine negative Stimmung zu induzieren. Zusätzlich zeigten die Untersuchungen der Herzfrequenzen, dass die angekündigte negativ gereizte Gruppe (AL) die am schwächsten ausgeprägte negative Belastung durch die experimentelle Prozedur erfuhren. So wiesen diese Tiere eine deutlich weniger ausgeprägte Verschiebung der autonomen Balance in Richtung sympathischer Kontrolle im Vergleich zu der

Kontrollgruppe und zu allen weiteren Behandlungsgruppen bei den untersuchten Parametern der Herzaktivität auf (Mahnhardt, 2015).

Es ist anzunehmen, dass die CRH-Konzentrationen zu Beginn des Versuchs, ähnlich wie die ACTH-Werte, bei allen Behandlungsgruppen erhöht waren und erst im Laufe der Habituation während des Versuchs wieder sanken. Da für keine der Behandlungsgruppen eine signifikant erhöhte Konzentration an Cortisol im Speichel oder im Blutplasma nachweisbar waren, konnte auch keine erhöhte mRNA-Konzentration des Glucocorticoidrezeptors nachgewiesen werden. Lediglich eine numerische Erhöhung der mRNA-Konzentrationen des GRs in der Amygdala bei den Tieren der Behandlungsgruppe AL würde für eine verstärkte Aktivierung des limbischen Systems durch den angekündigten Aversivreiz sprechen (zusammengefasst in Herman et al., 2005). Da diese Behandlungsgruppe aber keine verstärkte Cortisolausschüttung oder erhöhte CRH-Konzentrationen zeigt, ist davon auszugehen, dass dieser Effekt auf tierindividuelle Unterschiede zurückzuführen ist. Zudem zeigen die kardiologischen Untersuchungen innerhalb unseres Projektes, dass insbesondere für die Gruppe AL keine Erhöhung, sondern sogar eine eindeutige Abnahme der Basalherzfrequenz festgestellt werden konnte (Mahnhardt, 2015). Lee et al. (2005) zufolge werden niedrigere Basalherzfrequenzen bei Menschen mit induzierten positiven Emotionen in Verbindung gebracht. Dies bestärkt die Annahme, dass die Tiere der Gruppe AL durch die experimentelle Prozedur weniger negativ belastet waren als die Tiere aller anderen Behandlungsgruppen. Vermutlich wurde durch die Ankündigung des aversiven Stimulus die aversive Wirkung geschwächt, sodass die Schweine schnell an den Reiz habituierten.

Zusätzlich wurden die Nebennieren auf mögliche Änderungen bezüglich Größe und Gewicht, Zelldichte in Rinde und Mark sowie Verhältnis der Flächen von Rinde zu Mark auf mögliche Behandlungseffekte überprüft. Bereits Selye zeigte den Zusammenhang zwischen chronischem Stress und der morphologischen Veränderung der Nebennieren. Sowohl beim chronisch gestressten Menschen als auch bei Tieren sind die Nebennieren, rechts und links gleichermaßen, signifikant vergrößert und folglich auch schwerer. Clark et al. (2006) konnten für Delfine zeigen, dass bei chronisch gestressten Tieren im Vergleich zu akut gestressten die Nebennieren nicht nur signifikant schwerer sind, sondern auch ein signifikant verändertes Verhältnis von Rindenfläche zu Markfläche zeigen. Die Fläche der Rinde nahm im Vergleich zum Mark signifikant zu. Dies ist auf die verstärkte Produktion von GCs zurückzuführen. Den gleichen Effekt konnten Haussmann et al. (2000) bei trächtigen Sauen nach Gabe von ACTH in Kombination mit Restriktionshaltung nachweisen. Otten et al. (2010) konnten einen signifikanten Einfluss von pränatalem Stress auf das Gewicht der Nebennieren der Ferkel vier

Tage nach der Geburt, sowie auf die Zelldichte in Rinde und Mark nach 28 Tagen zeigen. Sowohl das Gewicht als auch die Zelldichte nahmen zu. Innerhalb unserer Studie nahmen wir ursprünglich an, dass die aversiv und ambivalent gereizten Tiere über die Dauer von vier Wochen chronischen Stress erfahren würden. Tatsächlich aber zeigten die Nebennieren keine morphologischen Veränderungen. Demzufolge konnte innerhalb unseres Versuches kein chronischer Stress über die Induktion von negativen oder ambivalenten Stimmungen nachgewiesen werden.

Alle untersuchten Parameter der HPA-Achse (bis auf die Genexpression von CRH und GR) wurden signifikant vom Durchgangseffekt beeinflusst. Dieser deutet auf mögliche genetische (Mutttertier, Vatertier) als auch Wurfefekte (Jahreszeit, Handling, Verhalten Mutttertier) hin. Für Pferde konnte bereits ein Einfluss der Jahreszeit auf die ACTH- und Cortisol-Konzentrationen im Plasma nachgewiesen werden, die demnach im Herbst bzw. im Frühling erhöht waren (Cordero et al., 2012). Das Alter hatte innerhalb der Studie von Cordero keinen Effekt. Für CRH, ACTH und Cortisol ist bekannt, dass die Konzentrationen einer circadianen Rhythmik unterliegen (Griffith und Minton, 1991; Klemcke et al., 1989; Ekkel et al., 1996, 1997). Schweine weisen im Allgemeinen morgens höhere ACTH- (Blut) und Basalcortisolkonzentrationen (im Blut und im Speichel) auf als am Nachmittag oder am Abend (Barnett et al., 1981; Bate und Hacker., 1985; Becker et al., 1985; Evans et al., 1988; Griffith und Minton, 1991; Janssens et al., 1995). Nur wenige Studien berichten von erhöhten Cortisolwerten am Nachmittag (Engeland et al., 1977; Griffith und Minton, 1991). Die circadiane Rhythmik der Cortisolkonzentrationen tritt bei Schweinen verstärkt mit zunehmendem Alter auf und konnten von Ekkel et al. (1996) für 8-Wochen alte Tiere nachgewiesen werden. Ekkel konnte 1997 zudem höhere Cortisolkonzentrationen bei 15-Wochen alten Schweinen im Vergleich zu zehn Wochen alten Schweinen nachweisen. In einem Alter von vier Wochen verschiebt sich das Verhältnis von freiem Cortisol in Richtung gebundener Form (an CBG) im Blutplasma. Mit einem Alter von sechs Wochen ist dieser Prozess bei den Schweinen abgeschlossen (Kattesh et al., 1990). Innerhalb unserer Studie wurden bewusst die Speichelproben für die Cortisolbestimmung zu stets gleicher Zeit am Vormittag genommen, um so das Tageshoch der Cortisolwerte zu erhalten. Ein Effekt des Alters kann nicht eindeutig ausgeschlossen werden, da die Tiere zu Versuchsbeginn fünf Wochen und zum Ende zehn Wochen alt waren und gerade innerhalb dieser Lebensspanne Entwicklungen bezüglich der Cortisolkonzentrationen im Blut und Speichel stattfinden.

Die Aktivität der HPA-Achse zeigt eine große individuelle Varianz, die bereits sehr gut untersucht wurde (zusammengefasst in Mormede et al., 2011 und Sautron et al., 2015) und eine Erklärung für die gezeigten signifikanten Durchgangseffekte sein könnte.

#### 4.4 Effekte auf die Neurotransmitter und deren Metaboliten

---

Sowohl der NAc als auch das VTA spielen eine zentrale Rolle im mesolimbischen System. Dies ist für die Entstehung von Emotionen (insbesondere Positive) von Bedeutung (Mitchell, Phillips, 2007) und wird über dopaminerge Neuronen reguliert. Der PFC ist eng mit dem limbischen System assoziiert (Moraft und Yeterian, 2002) und ist entscheidend für kognitive Prozesse (z.B. Arbeitsgedächtnis, Fletcher und Henson, 2001) und emotionale Reaktionen (Stuss und Levine, 2002). Psychischer Stress führt über die Erregung des limbischen Systems zur Aktivierung des *Nucleus coeruleus* und des Hypothalamus und somit zur Erregung des SAM-Systems. Als Folge werden aus den Nervenendigungen des Sympathikus vor allem A und NA ausgeschüttet. Die Katecholamine erhöhen die Belastbarkeit und Leistungsfähigkeit des Organismus über die verstärkte Durchblutung von Herz- und Skelettmuskulatur, die Erhöhung der Herzfrequenz sowie über die verstärkte Lipolyse und Proteolyse zur besseren Energieversorgung.

Innerhalb unserer Studie konnte eine signifikant erhöhte NA-Konzentration im PFC der Tiere der Behandlungsgruppe AL im Vergleich zur Gruppe ZL nachgewiesen werden. Es ist für Ratten bekannt, dass die verstärkte Freisetzung von Cortisol über eine aversive Reizung möglich ist und damit verbunden die Konzentration von NA und 5-HT vor allem im PFC ansteigen (Tomie et al., 2004). Stress kann somit die NA-Konzentrationen im PFC erhöhen (Adell et al., 1988a, b; Nisenbaum et al., 1991, Hayley et al., 2001). Unsere Tiere (AL, ZL) könnten folglich den Luftstoß als aversiven Reiz bewertet und somit als Stress empfunden haben. Es ist aber anzunehmen, dass der Luftstoß zum Ende des Versuchs in seiner aversiven Wirkung geschwächt war. Diese Annahme ist begründet durch die fehlende Erhöhung der DA-Konzentration im PFC, die bereits durch milde Stressoren induziert wird (Deutch und Roth, 1990). Zudem ist die NA-Konzentration nur moderat erhöht gewesen. Dies ist typisch für stressfreie, aber erregende Bedingungen, die den PFC stärken und die Amygdala hemmen (Arnsten, 2000). Gegen die Bewertung als aversiv wirkenden Stimulus sprechen zusätzlich die nicht erhöhten Cortisol- und 5-HT-Konzentrationen (im PFC), die Tomie et al. (2004) zur Folge, mit einer aversiven Reizung

verbunden sind. Die Verhaltensbeobachtungen und Analysen der Herzfrequenzdaten von Mahnhardt (2015) unterstützen diese Einordnung, da die Tiere der Gruppe AL eine Verschiebung des Verhaltens von aktiv zum Beginn des Versuchs zu passivem *Coping* zum Ende des Versuchs zeigten und somit an den aversiven Stimulus habituierten. Zudem sanken die Basalherzfrequenzen der Gruppe AL dem Alter der Tiere entsprechend zum Ende des Versuchs, während die positiv stimulierten Tiere einen Anstieg zeigten. Auch die Verschiebung der autonomen Balance in Richtung sympathische Kontrolle fiel im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen geringer aus. Folglich zeigten die Tiere der Gruppe AL, entgegen unseren Erwartungen, die geringste Belastung durch die experimentelle Prozedur.

Der VTA ist mit den dort vorkommenden dopaminergen Neuronen entscheidend für die Funktionalität des „Belohnungssystems“. Sowohl corticale als auch subcorticale Teile des Gehirns beim Menschen und bei Tieren werden von serotonergen Neuronen innerviert, die dem Raphekern im Mittelhirn entspringen und 5-HT mit Belohnung und Bestrafung in Verbindung bringen (Hornung, 2003). Die serotonerge Modellierung des Belohnungssystems erfolgt vermutlich über mehrere Subtypen von 5-HT-Rezeptoren (Kranz et al., 2010). Studien konnten zeigen, dass 5-HT vor allem eine Rolle bei verzögerten zukünftig erwarteten Belohnungen spielt. Miyazaki et al. (2012) behaupten beispielsweise, dass über das serotonerge System bei Ratten die Abnahme von aktivem Verhalten vermittelt wird, um so einerseits zukünftige Belohnungen abzuwarten oder auch andererseits angekündigte Bestrafungen zu vermeiden. Sie fanden heraus, dass die Aktivität der serotonergen Neuronen bei Ratten, die Futter und Wasser als Belohnung erwarteten, steigt. Diese verstärkte serotonerge Aktivität ermöglicht es den Ratten geduldig auf ihre Belohnung zu warten. Letztendlich ist es aber die Interaktion von dopaminergem und serotonerem System, die die Kontrolle der ethologischen Antwort auf Strafe oder Belohnung ermöglicht (Cools et al., 2011). Entgegen unseren Erwartungen war das Verhältnis von 5-HIAA zu 5-HT im VTA bei der Behandlungsgruppe AF im Vergleich zur Gruppe AK signifikant erhöht. Steigt die Aktivität der serotonergen Neuronen durch Stress, wird der Umsatz von 5-HT erhöht. Daher steigen die Konzentration des Metaboliten 5-HIAA und somit auch das Verhältnis 5-HIAA/5-HT (Blanchard et al., 1993; Shannon et al., 1986). Demzufolge haben die Tiere der Behandlungsgruppe AF den angekündigten positiven Stimulus Futter als aufregend empfunden und die verstärkte serotonerge Aktivität führte nicht, wie bei Miyazaki et al. (2012) beschrieben, zu einem geduldfähigen Warteverhalten. Die verstärkte serotonerge Aktivität des Gehirns wird in verschiedenen Studien als eine Möglichkeit der Stressbewältigung (*Coping*-Strategie) beschrieben (Koolhaas et al., 2007; Puglisi-Allegra, Andolina, 2015;). Anhand der Verhaltensbeobachtungen und der Herzfrequenzmessungen von Mahnhardt (2015) konnte bestätigt werden, dass die

Tiere der Gruppe AF dauerhaft erregt waren. Die Basalherzfrequenzen waren erhöht, das Verhalten der Tiere war aktiver im Vergleich zur Kontrollgruppe (FF) und es zeigte sich eine verstärkte sympathische Aktivierung. Im Gegensatz dazu verhielten sich die Tiere der Gruppe AK passiver. Folglich habituierten diese Tiere (AK) an den aversiven Stimulus oder ihr Verhalten wurde über Neurotransmitter gehemmt, um den aversiven Stimulus abzuwarten. Da jedoch keine Aktivierung des dopaminergen Systems für die Behandlungsgruppe AK gezeigt werden konnte, erfolgte vermutlich die Habituation der Tiere an den Aversivreiz. Die Daten der Herzfrequenzanalysen zeigten für die Tiere der Gruppe AK, dass auch sie in einem dauerhaften Erregungszustand waren, da sie Futter (Belohnung) erwarteten. Da diese Tiere neben der Belohnung aber auch den aversiven Reiz erwarteten, waren sie weniger aktiv im Vergleich zu den Tieren der Gruppe AF (Mahnhardt, 2015).

Auffällig ist, dass die Behandlungsgruppe ZL die niedrigsten DA-, DOPAC- (Vorstufe von DA)- und HVA-Konzentrationen (Metabolit von DA) im VTA aufwies. Individuelle Variationen der dopaminergen Stressantwort im VTA werden mit individuellen *Coping*-Strategien assoziiert (Russo und Nestler, 2013). Demnach kann die gehemmte DA-Antwort als eine passive Bewältigungsstrategie gewertet werden, vor allem dann, wenn die Situation als unkontrollierbar bewertet wird (Cabib und Puglisi-Allegra, 2012). Es ist anzunehmen, dass die Tiere der Gruppe ZL die Situation als unkontrollierbar und ausweglos bewerteten und somit die Hemmung der dopaminergen Stressantwort einhergeht.

Im Gegensatz dazu zeigte die Behandlungsgruppe ZF erhöhte Konzentrationen (DOPAC, DA, HVA) im NAc. Der erhöhte Umsatz sowie die verstärkte Freisetzung von DA im NAc werden durch wiederholte Stresssituationen induziert (Russo und Nestler, 2013). Demnach bewirkte die zufällige Fütterung der Tiere (ZF) die Aktivierung der dopaminergen Neuronen und erhöhte somit die Freisetzung und den Umsatz von DA im NAc. Erhöhte DA-Konzentrationen im NAc werden durch schmackhaftes Futter induziert (zusammengefasst in Baldo und Kelley, 2007) und stehen offenbar in Verbindung mit Belohnungen. Die Aktivität der dopaminergen Neuronen steigt infolge unerwarteter Belohnungen an und verstärkt sich über die Zeit, sodass bereits Hinweise auf eine Belohnung ausreichen, um die DA-Antwort auszulösen (Schultz, 1997). Zudem hat die Freisetzung von DA im NAc eine verstärkende Wirkung auf jenes Verhalten, das förderlich ist, eine Belohnung zu erreichen oder auch um einem aversiven Stimulus zu entkommen (Berridge, 2007; Salamone et al., 2007; Imperato et al., 1992). Die Verhaltensbeobachtungen und die kardiologischen Untersuchungen konnten dies bestätigen. Die Gruppe ZF zeigte eine erhöhte Aktivität sowie eine verstärkte sympathische Aktivierung, die mit einer Dauererregung der Tiere einherging (Mahnhardt et al., 2014).

In den von uns untersuchten Hirnregionen wurden die Neurotransmitter von Durchgangseffekten beeinflusst (s. Kap. 3.4). Neurotransmitterstudien werden meist an männlichen Ratten und Mäusen durchgeführt und die Ergebnisse als allgemeingültig postuliert. Mittlerweile weiß man jedoch, dass das Geschlecht einen Einfluss auf das mesolimbische DA-System hat und die Neuronenantwort im VTA bei weiblichen Tieren durchaus anders ausfällt. Zudem ist der soziale Kontext (z.B. soziale Niederlagen) ein entscheidender Faktor für den Ablauf der Signalwege im mesolimbischen System (Trainor, 2011). Da für unsere Studie, bis auf fünf Kastraten, nur weibliche Tiere zum Einsatz kamen, ist der Einfluss des Geschlechts vermutlich eher gering. Es ist jedoch möglich, dass sich die einzelnen Durchgänge und somit die einzelnen Würfe aufgrund genetischer Effekte unterscheiden. Durch Polymorphismen innerhalb der Gene *MAOA*, *COMT* und *5HTTLPR*, welche vorhersehbare Effekte auf die Verfügbarkeit der Neurotransmitter DA, NA und 5-HT haben, kann die kognitive Leistung zwischen Individuen variieren (Barnett et al., 2011). Pränataler Stress hat ebenfalls einen Einfluss auf das spätere Neurotransmitterprofil (Bowman et al., 2004, Kanitz et al., 2006) und kann von uns als mögliche Einflussgröße nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

#### 4.5 Effekte auf die Parameter des Immunsystems

---

Die *in vitro* **Stimulation** der **Lymphozyten** mit Mitogenen, wie ConA und PHA, sowie dem Superantigen SEB ist ein indirektes Maß für die **Zellproliferation** und somit ein Nachweis für die immunsuppressive oder -fördernde Wirkung der untersuchten Behandlungen. Die Mitogene ConA und PHA aktivieren T-Zellen. Das Superantigen SEB stimuliert neben T-Zellen auch einen kleinen Anteil an B-Zellen (Salvadori und Tournefier, 1996). Die Erzeugung positiver Stimmungen durch die Anreicherung der Haltungsumwelt, beispielsweise mittels eines Ton-Schalter-Futterautomaten, wirkte sich nachweislich verstärkend auf die Mitogen-induzierte T-Zellproliferation *in vitro* aus (Ernst et al., 2006). Innerhalb unserer Studie wurde die Proliferation der Lymphozyten nicht wie erwartet durch die positive Antizipation von Futter (AF) verstärkt und durch die aversive und die ambivalente Antizipation gesenkt. Für die mit ConA und PHA induzierte T-Lymphozytenproliferation zeigte sich als Haupteffekt der Einfluss des Zeitpunktes. So sank, entgegen unseren Erwartungen, der PI zum Ende des Versuches durch die Stimulation mit ConA oder PHA. Die SEB-induzierte Lymphozytenproliferation blieb hingegen unverändert. Vermutlich wurde die experimentelle Prozedur durch die Tiere aller

Behandlungsgruppen als „belastend“ bewertet, worauf die Verschiebung der autonomen Balance in Richtung sympathische Kontrolle bei allen Behandlungsgruppen hinweist (Mahnhardt, 2015). Die Tiere waren demnach in einer erregten Stimmung, die verantwortlich für die abnehmende T-Zellproliferation bei Stimulation mit den Mitogenen ConA und PHA sein könnte. Die Proliferation von T-Zellen wird Studien von Tuchscherer et al. (1998) und Kanitz et al. (2004) zufolge durch psychosozialen Stress gehemmt, die von B-Zellen dagegen nicht. Da SEB sowohl T- als auch B-Zellen stimuliert, blieb die Lymphozytenproliferation unverändert. Sutherland et al. (2006) konnten bei chronisch gestressten Schweinen (Hitzestress) eine erhöhte B-Lymphozytenproliferation nach LPS Stimulation nachweisen, während die T-Zellproliferation nach ConA-Stimulation unverändert blieb. Im Gegensatz dazu fanden Hicks et al. (1998), ebenfalls bei Schweinen, für die PHA-stimulierte T-Zellproliferation keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe, die Kälte-, Hitze- oder Transportstress für jeweils 4 h ausgesetzt waren. Die Art und Dauer des Stressors ist demnach entscheidend, ob die Lymphozytenproliferation beeinflusst wird.

Für die ermittelten PIs nach der Stimulation mit PHA und ConA konnten höhere Werte im Vergleich zur Stimulation mit SEB gezeigt werden. Diese Unterschiede sind auf den durch Mitogene oder Superantigene erreichten prozentualen Anteil an Zellen zurückzuführen. So können Mitogene zwischen 80 und 90 % der Zellen stimulieren, während Superantigene nur 20-30 % der Zellen erreichen (Kotb, 1995). Es lässt sich allgemein sagen, dass der LTT eine Methode ist, deren Ergebnisse stark durch individuelle Variationen innerhalb eines Wurfs sowie zwischen verschiedenen Rassen geprägt ist (Joling et al., 1993) und zudem von Faktoren, wie beispielsweise der Ernährung und dem Alter, abhängen (Kristensen et al., 1982).

Durch akuten Stress wird die IgG-, aber auch die IgA-Produktion erhöht, während chronischer Stress die **Immunglobulinproduktion** hemmt (Silbermann et al., 2003; Jemmott et al., 1983). Für das sekretorische IgA (sIgA) konnte durch Studien am Menschen ein Zusammenhang zwischen der Sekretionsrate (v.a. Speichel) und der vorherrschenden Stimmung nachgewiesen werden. Stone et al. (1987, 1994) untersuchten den Einfluss von täglichen Ereignissen und Stimmungen auf die Antigen-spezifische sIgA-Antwort durch die orale Gabe eines fremden Proteins (z. B. Albumin vom Kaninchen). Sie konnten zeigen, dass die Konzentration des sIgAs an Tagen mit negativer Stimmung verringert und an Tagen mit positiver Stimmung erhöht war. Hucklebridge et al. (2000) hingegen fanden sowohl für positive als auch für negative Stimmungen eine erhöhte Sekretionsrate sowie eine erhöhte Konzentration des IgAs. Gourkow und Phillips (2015) wiederum konnten bei Katzen in Tierheimen eine verstärkte sIgA-Sekretion sowie eine reduzierte Anfälligkeit für Atemwegserkrankungen durch menschliche Fürsorge

(streicheln, Fellpflege, spielen) nachweisen. Innerhalb unserer Studie sollten durch die langfristige Auswirkung der verwendeten Behandlungen die Immunglobulinkonzentrationen je nach Intention der Behandlung (positiv, negativ, ambivalent) entweder gesteigert oder gesenkt werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass alle untersuchten Immunglobulinkonzentrationen im Mittel zum Ende des Experiments anstiegen. Die IgA-Konzentrationen stiegen von 0,27 mg/ml auf 0,81 mg/ml, die IgG-Konzentrationen von 6,88 mg/ml auf 8,80 mg/ml und die IgM-Konzentrationen von 2,25 mg/ml auf 3,05 mg/ml an. Ähnliche Konzentrationsanstiege von IgA, IgG und IgM im Serum wurden bereits von Curtis und Bourne (1971) und von Bourne nochmals 1973 für Ferkel in der 5. und der 10. LW beschrieben. IgA stieg bei deren Untersuchungen von 0,2 mg/ml auf 0,9 mg/ml, IgG von 7,5 mg/ml auf 8,5 mg/ml und IgM von 1,1 mg/ml auf 1,9 mg/ml an. Da die in unserer Studie bestimmte IgM-Konzentration bereits zu Beginn des Versuchs sehr hoch war, ist anzunehmen, dass die Tiere schon vor Versuchsbeginn Pathogene, wie beispielsweise *E. coli*, abwehren mussten (Porter und Hill, 1970).

Die IgA-Konzentrationen der verschiedenen Behandlungsgruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander, zeigten jedoch alle den gleichen signifikanten Anstieg über die Zeit. Der Anstieg der IgG-Konzentrationen ist nur bei der Behandlungsgruppe ZL signifikant gewesen. Die IgM-Konzentrationen stiegen bei allen Behandlungsgruppen, ausgenommen bei den Gruppen AF und FF, signifikant an. Da jedoch die Differenzen der Start- und Endwerte für keine der Immunglobulin- und Behandlungsgruppen signifikant unterschiedlich zueinander waren, ist anzunehmen, dass die Behandlungen keinen starken suppressiven oder fördernden Effekt auf die Ig-Konzentration im Serum haben. Der für alle Immunglobulinklassen beobachtete Anstieg, wie bereits bei Curtis und Bourne (1971) beschrieben, ist lediglich ein Alterseffekt. Der Beginn der Eigensynthese der einzelnen Immunglobuline erfolgt dabei nach der Geburt zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Zuerst startet die IgM-Produktion in der 2. LW, gefolgt von IgA in der 4. LW und letztlich IgG in der 6. bis 7. LW (Habe, 1974, Bourne, 1973). Der Anstieg von IgG und IgM verläuft wie in der Literatur beschrieben, daher erscheint eine verstärkte IgG-Synthese durch die Behandlung ZL und eine Hemmung des Anstiegs von IgM durch die Behandlungen AF und FF abwegig. Bereits zu Beginn des Versuches waren die ermittelten Plasmakonzentrationen von IgG und IgM in den verschiedenen Behandlungsgruppen numerisch stark zueinander verschieden, aber trotz allem nicht signifikant unterschiedlich. Im Gegensatz dazu waren die IgA-Konzentrationen zum Beginn für alle Behandlungsgruppen ähnlich. Der signifikante Anstieg der IgA-Konzentrationen verlief aus diesem Grund für alle Gruppen homogen. Der vermeintliche Unterschied zwischen den

Behandlungsgruppen bei IgG und IgM ist vermutlich auf die tierindividuellen Unterschiede zurückzuführen, die auch bereits von Bourne (1973) beschrieben wurden.

Sowohl chronischer als auch akuter Stress haben einen Einfluss auf die **Produktion von Zytokinen** und können je nach Ausrichtung eine Beeinträchtigung oder Steigerung der Immunkompetenz bewirken (Glaser und Kiecolt-Glaser, 2005; Dhabhar, 2009). Die Immunmodulation erfolgt hauptsächlich über GCs, die über pharmakologische Konzentrationen immunsuppressiv und über physiologische Konzentrationen immunfördernd wirken können. Mit der Zugabe von LPS aus *E. coli* beim Vollbluttest wurden behandlungsbedingte Veränderungen des angeborenen Immunsystems untersucht. LPS ist ein starker Aktivator von Monozyten und Makrophagen (Randolph et al., 2008) sowie ein B-Zell-Mitogen (Skidmore et al., 1975). Im Zellkulturüberstandstest wurde über die Stimulation mit den Mitogenen ConA, PHA oder SEB das erworbene Immunsystem untersucht.

Entgegen unseren Erwartungen wurde die Mitogen-stimulierte Lymphozytenproliferation durch die verschiedenen Behandlungen nicht beeinflusst. Lediglich die TNF- $\alpha$  und die IL-10-Konzentrationen waren zu Beginn des Versuchs bei den Tieren aller Behandlungsgruppen erhöht. Dies ist ein Hinweis für eine Infektion mit *E. coli*. Absatzferkel zeigen häufig während der Umstellung auf feste Nahrung Durchfallerkrankungen, die auf eine Infektion mit *E. coli* zurückzuführen sind. Die Ansteckung der Ferkel erfolgt über den eigenen Dickdarm, in dem sich nach dem Absetzen verstärkt *E. coli* vermehren. Die freigesetzten Endotoxine (z.B. LPS) stören die Motilität des Darms und begünstigen so das Aufwandern der Keime in den Dünndarm. Im Dünndarm erfolgen die Festsetzung der Keime und eine erneute Freisetzung der Toxine (Eich und Schmidt, 1998). Diese bakteriellen Produkte (Endotoxine) bewirken vor allem einen Anstieg der Expression des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  im Ileum, einem Teil des Dünndarms (Pie et al., 2004). *E. coli* stimuliert zusätzlich die Produktion von IL-10 (Hessle et al., 2000), einem antiinflammatorischen Zytokin, das die T-Zellzytotoxizität und IFN- $\gamma$ -Produktion herunterreguliert (D'Andrea et al., 1993) und die B-Zellreifung stimuliert (Rousset et al., 1992). Die Produktion des antiinflammatorischen IL-4 wird hingegen durch *E. coli* nicht beeinflusst (Hessle et al., 2000). Unsere Untersuchungen konnten diese Effekte zum Teil bestätigen. So blieben bei den Tieren aller Behandlungsgruppen die Mitogen-induzierten IL-4- und IFN- $\gamma$ -Produktionen im Zellkulturüberstand unverändert, während die IL-10- und die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen im Vollblut zum Ende des Versuches signifikant abnahm. Die Ergebnisse des Vollbluttests widersprechen dem zu erwartenden altersbedingten Anstieg, der von Moya et al. (2007) und Matteri et al. (1998) für Plasmauntersuchungen beschrieben wurde, und lassen zusätzlich keine Behandlungseffekte erkennen. Die zu Beginn des Versuchs

stark erhöhten TNF- $\alpha$ -Konzentrationen im Vollblut nach LPS-Stimulation gehen einher mit den auftretenden Durchfallerkrankungen der Ferkel im Zuge einer *E. coli*-Infektion und der Umstellung auf feste Nahrung nach dem Absetzen. Unsere Beobachtungen (s. Tab. 3.2) sowie der ermittelte Durchgangseffekt machen deutlich, dass einige Durchgänge stärker von Infektionen betroffen waren als andere. Die Durchfallerkrankungen traten vor allem innerhalb der ersten Versuchswoche auf, wodurch die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen zu Beginn des Versuchs erhöht waren. Der altersbedingte Anstieg von TNF- $\alpha$  nach LPS-Stimulation wird vermutlich durch die erwähnte *E. coli*-Infektion und die dadurch bedingten erhöhten Anfangswerte überlagert. Die Behandlungsgruppen ZL und ZF für TNF- $\alpha$  und AL für IL-10 zeigten zwischen den Anfangs- und Endwerten bei den LPS-stimulierten Vollblutproben signifikante Unterschiede. Diese sind vermutlich auf den bereits erwähnten Durchgangseffekt zurückzuführen und sprechen somit gegen einen Behandlungseffekt.

Die IL-10-Konzentration nach LPS-Stimulation im Vollblut sowohl nach Stimulation mit ConA und SEB im Zellkulturüberstand war zum Versuchsbeginn (IL-10 [pg/ml] LPS: 44,3; ConA: 60,8; SEB: 37,7) höher als am Versuchsende (IL-10 [pg/ml] LPS: 31,3; ConA: 55,5; SEB: 34,5). Da aber die Konzentrationsunterschiede zwar statistisch signifikant, aber sehr gering waren, ist davon auszugehen, dass diese biologisch nicht relevant sind. Zum Vergleich, Hessle et al. (2000) konnten durch die Zugabe von 10  $\mu$ g/ml LPS die IL-10-Synthese induzieren und Konzentrationen über 600 pg/ml nachweisen.

Die persönliche *Coping*-Fähigkeit eines Individuums während einer belastenden Situation beeinflusst die **NK-Zell-Aktivität** (Schlesinger und Yodfat, 1991). So zeigten Kibbutz-Mitglieder mit einer diagnostizierten Angststörung deutlich geringere NK-Aktivitäten im Vergleich zu gesunden Mitgliedern. Bei Ratten kann durch sozialen Stress (z.B. Konfrontation) ebenfalls die NK-Aktivität bei den subdominanten Tieren verringert sein (Stefanski, 2001). Studien mit Schweinen zeigten wiederum, dass die Injektion von ACTH die Aktivität der NK-Zellen vor allem dann steigert, wenn diese aufgrund des circadianen Rhythmus in ihrer Konzentration verringert sind (McGlone et al., 1991). Die Hemmung der NK-Aktivität erfolgt vermutlich über die Freisetzung des CRH (Irwin et al., 1988).

Innerhalb unserer Studie sollten die Tiere der Behandlungsgruppe AL im Falle einer erfolgreich induzierten negativen Stimmung geringere NK-Zell-Aktivitäten aufweisen, während bei den Tieren in der Behandlungsgruppe AF eine gesteigerte zytotoxische Aktivität der NK-Zellen aufgrund der induzierten positiven Stimmung erwartet wurde. Die Aktivität der NK-Zellen wurde jedoch durch keine der Behandlungen beeinflusst.

Die NK-Zell-Aktivität kann neben Modulation durch emotionale Stimuli auch durch die Freisetzung von IL-10 durch Makrophagen nach Kontakt mit bakteriellen Produkten gehemmt werden (Hessle et al., 2000). Da die IL-10-Konzentrationen zu Beginn des Versuchs nur moderat erhöht waren, ist anzunehmen, dass diese die NK-Zell-Aktivität nicht beeinflusst haben. Dies weist darauf hin, dass die verwendeten Behandlungen nicht geeignet sind, um Stimmungen zu induzieren, die die NK-Zell-Aktivität beeinflussen können.

Es ist allgemein anerkannt, dass bei gesunden Tieren hämatologische Parameter einer gewissen Verteilung folgen, bei erkrankten Tieren hingegen ist diese Verteilung verändert (Lumsden und Mullen, 1978). Beim Schwein werden die hämatologischen Parameter unter anderem durch die Faktoren Genetik (Rasse), Geschlecht, Fütterung, Trächtigkeit und Laktation sowie Alter und Gewicht beeinflusst (Heinritzi und Plonait, 2001). Stress ist der bedeutendste Faktor, der haltungsbedingt auftreten kann (Heinritzi und Plonait, 2001; Grün et al., 2013). Das weiße Blutbild ist ein Anhaltspunkt, um den erfahrenen Stress der Tiere zu erfassen (Davis et al., 2008). Zum weißen Blutbild gehören die Bestimmung von Leukozytenzahlen und -profil, das sogenannte Differentialblutbild. Innerhalb unserer Studie zeigten die Tiere aller Behandlungsgruppen keine signifikant veränderte Gesamtleukozytenzahl. Mit einem mittleren Wert von  $14,9 \times 10^9$  Zellen/l lag die Leukozytenzahl im für Schweine gültigen Referenzbereich von  $10 - 22 \times 10^9$  Zellen/l (Kraft und Dürr, 2005). Die Tiere mussten offenbar keine schweren Infektionen überstehen.

Die stressbedingte auftretende Neutrophilie (Zunahme der Neutrophilenzahl) und Lymphopenie (Abnahme der Lymphozytenzahl) ist eine Folge der vermehrten Cortisolausschüttung (Stull et al., 1999). Der daraus resultierende Anstieg des N/L-Verhältnisses wurde bereits mehrfach in Studien bei gestressten Tieren dokumentiert. So zeigten Schweine nach dem Transport per Schiff (McGlone et al., 1993), sowie sozialem Stress ausgesetzte Hühner (Gross und Siegel, 1983) erhöhte N/L-Verhältnisse. Die in unseren Versuchen zu Beginn in allen Behandlungsgruppen auftretenden erhöhten N/L-Verhältnisse können, Stull et al. (1999) zufolge, mit dem Absatzstress, der Umstellung auf feste Nahrung sowie mit der ersten Abwehr von Pathogenen, beispielsweise *E. coli*-Infektion, verbunden sein. Dass die Tiere mit großer Wahrscheinlichkeit *E. coli*-Infektionen aufwiesen, kann durch die beobachteten Durchfallerkrankungen, insbesondere innerhalb der ersten Versuchswochen, bestätigt werden (s. Tab. 3.2). Da es sich meist um leichte Infektionen handelte, die schnell überstanden waren, zeigten die Tiere im Verlauf des Versuchs eine altersgerechte Gewichtszunahme.

Friendship et al. (1984) und Kraft et al. (1999) sind im Gegensatz zu Stull et al. (1999) der Ansicht, dass das Verhältnis von Lymphozyten zu Neutrophilen generell bei jungen Schweinen (Absatzferkel) zugunsten der Neutrophilen verschoben ist. Das lymphozytäre Blutbild ist dann erst beim Läufer Schwein nachweisbar (Chmielowiec-Korzeniowska et al., 2013) und konnte so auch von uns bestätigt werden.

Dass die Behandlungsgruppen AK und ZL einen signifikanten Anstieg der Lymphozytenzahlen sowie einen signifikanten Abfall der Neutrophilenzahlen zum Ende des Versuchs aufweisen, entspricht nicht den Erwartungen eines negativen Effekts einer induzierten ambivalenten Stimmung bei der Gruppe AK. Die aufgetretenen signifikanten Änderungen im Differentialblutbild sind, wie bereits erläutert, altersbedingte Änderungen, die zusätzlich durch Faktoren wie Nahrungsumstellung und Infektionen beeinflusst werden. Der signifikante Unterschied der Lymphozytenzahlen zwischen den Gruppen AK und FF zum Ende des Versuchs steht womöglich mit dem geringen Anstieg der Lymphozytenzahlen in der Behandlungsgruppe FF im Zusammenhang, der vermutlich nicht behandlungsbedingt, sondern durch tierindividuelle Unterschiede innerhalb der Gruppe FF begründet ist. Auch wenn die Abnahme des N/L-Verhältnisses in der Behandlungsgruppe ZL signifikant war, ist davon auszugehen, dass die Verminderung nur auf tierindividuelle Unterschiede begrenzt auf die Gruppe ZL zurückzuführen ist.

Die Anzahl der Monozyten sowie der basophilen und eosinophilen Granulozyten lag im jeweiligen Referenzbereich (Kraft und Dürr, 2005). Bei mentalem und psychischem Stress wären sowohl die Eosinophilen als auch die Basophilen in ihrer Anzahl dezimiert (Zheng et al., 2009; Mathur und Sachdev, 1958; Kerr, 1956; Dyke et al., 2008).

Um den gesundheitlichen Allgemeinzustand zu überprüfen, wurde das Gesamteiweiß im Plasma bestimmt. Besonders wichtig sind die Akute-Phase-Proteine (APP), die in der Leber synthetisiert werden und deren Anteil sich sehr schnell als Reaktion auf Infekte, Stress und Verletzungen ändern kann. Innerhalb der Akuten-Phase-Reaktion des angeborenen Immunsystems wird über die Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  die Synthese der positiv regulierten APP angeregt und die der negativ regulierten gesenkt. Die Konzentrationen von Haptoglobin (Hp), C-reaktivem Protein (CRP), Serum-Amyloid A und Schwein-Haupt-Akute-Phase-Protein (*Pig-Major Acute Phase Protein, Pig-MAP*) steigen nach überstandener Infektabwehr an. Albumin, ein Hauptbestandteil des Plasmas, zählt zu den negativ regulierten Akute-Phase-Proteinen. Neugeborene Ferkel weisen sehr geringe Gesamteiweißkonzentrationen auf, die direkt nach der Kolostrumaufnahme (1. bis 3. Lebenstag) ansteigen. Da die Ferkel in den ersten Tagen sehr schnell wachsen und somit das Blutvolumen schneller zunimmt als die eigene

Globulinsynthese, sinkt die Proteinkonzentration wieder, um dann auf einem konstanten Niveau zwischen dem 4. und 50. Lebenstag zu bleiben. Erst ab dem 51. Lebenstag übersteigen die Konzentrationen des Gesamteiweißes die Ausgangswerte nach Kolostrumaufnahme (Nerbas, 2008; Wehrend et al., 2000). Unsere Untersuchungen des Plasmas zeigten einen signifikanten Anstieg des Gesamteiweißgehaltes vom Beginn bis zum Ende des Versuchs, der bei allen Behandlungsgruppen im altersbedingten Referenzbereich von 50 bis 80 g/l lag (Faustini et al., 2000; Nerbas, 2008). Daher können schwere Infektionen bei den Tieren sowie Kontaminationen der Proben ausgeschlossen werden.

Innerhalb unserer Studie konnte ein signifikanter Einfluss des Faktors Durchgang ermittelt werden. Die Variationen zwischen den einzelnen Durchgängen sind genetisch bedingt oder durch Wurfefekte aufgetreten. Die verschiedenen Immunparameter unterliegen bei Schweinen starken individuellen Variationen (Edfors-Lilja et al., 1991; Joling et al., 1993). Dies wurde bereits auch durch mehrere Studien an Nagern und Menschen, insbesondere für die Produktion von Zytokinen, belegt (Suarez et al., 2003; Bidwell et al., 1999; Coppin et al., 2003; Cui et al., 2003; Kelm et al., 2001; Nieters et al., 2004). De Groot et al. (2005) konnten einen Einfluss des Wurfs, des Alters und des Geschlechts auf die Zytokinproduktion auf Proteinebene, nicht aber auf Ebene der mRNA-Expression, bei Schweinen nachweisen. Weiterhin ist bekannt, dass sowohl die Mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation als auch die Zytokinproduktion unter genetischer Kontrolle stehen (Edfors-Lilja et al., 1991; Jensen und Christensen, 1981). Die Expression von IL-4 differiert zudem zwischen den verschiedenen porcinen Zuchtlinien (Verfaillie et al., 2001; Raymond et al., 2004; Reddy et al., 2000). Neben genetischen Einflüssen auf die Immunkompetenz werden häufig externe Faktoren wie Stress, Ernährung oder Infektionen während der prä- und der postnatalen Entwicklung als Einflussgrößen beschrieben (Barker, 1992, 2004; Rhind et al., 2003; von Hertzen, 2002). Insbesondere bei Schweinen konnte durch pränatalen Stress und die vermehrte Ausschüttung von Cortisol ein Einfluss auf das Immunsystem des Nachwuchses nachgewiesen werden (Kanitz et al., 2003; Otten et al., 2000 und 2001; Tuchscherer et al., 2002). Levast et al. (2014) konnten einen Einfluss von extrinsischen Faktoren (z. B. Zusammensetzung des mütterlichen Kolostrums/ Milch) auf die prä- und postnatale Entwicklung des IgA nachweisen.

## 4.6 Fazit

---

Innerhalb dieser Studie sollten durch die wiederholte Antizipation eines Stimulus mit jeweils unterschiedlicher Valenz (positiv, negativ, ambivalent) langfristige Stimmungsänderungen bei Ferkeln induziert werden. Diese sollten wiederum über die neuroendokrine Modulation die Immunkompetenz je nach Valenz verbessern oder verschlechtern.

Unsere Studie zeigte jedoch, dass durch die wiederholte Antizipation eines positiven Reizes keine positive Stimmung bei Schweinen induziert werden konnte. Stattdessen zeigten die einen positiven Reiz antizipierenden Tiere eine Dauererregung, die langfristig eine eher negative Stimmung induzierte. Der ausgewählte Stimulus Futter konnte nachweislich nur kurzfristig eine positive Emotion induzieren, die durch ansteigende Herzfrequenz und das verstärkte aktive Verhalten sichtbar wurde. Diese affektive-emotionale Reaktion führte jedoch nicht zu einer langanhaltenden Änderung der Stimmung mit einer positiven Valenz (Mahnhardt, 2015). Die Immunkompetenz wurde bei den einen positiven Reiz antizipierenden Tieren nicht gesteigert. Die Tiere zeigten trotz der induzierten Dauererregung (Mahnhardt, 2015) jedoch auch keine verminderte Immunkompetenz. Dies konnte auch für die einen negativen Reiz antizipierenden Tiere (AL) gezeigt werden. Sie zeigten entgegen unseren Erwartungen nach anfänglicher Aktivität ein passives *Coping*-Verhalten gegenüber dem aversiven Stimulus Luftstoß (Mahnhardt, 2015). Zusätzlich zeigten die Tiere der Gruppe AL keine erhöhte Aktivität der HPA-Achse und nur moderat erhöhte NA-Konzentrationen im Präfrontalen Cortex, was gegen eine aversive Wirkung des Luftstoßes sprechen könnte (Arnsten, 2000). Vermutlich war der aversive Stimulus in seiner Langzeitwirkung zu schwach, sodass die Tiere an seine Wirkung habituierten. Für alle Tiere konnte eine im Verlauf des Versuchs erfolgte Habituation an die experimentelle Prozedur anhand der sinkenden ACTH- und Cortisolkonzentrationen gezeigt werden. Die Tiere, die eine positive Reizung durch den Stimulus Futter (AF, AK, ZF) erhielten, zeigten zum Ende des Versuchs erhöhte Basalherzfrequenzen und eine verstärkte sympathische Aktivierung, die auf eine mögliche Dauererregung durch die Erwartung des Futters zurückzuführen sind (Mahnhardt, 2015). Die negativ stimulierten Tiere (AL, ZL) sowie die Kontrollgruppe (FF) zeigten hingegen geringere Basalherzfrequenzen zum Ende des Versuchs. Für alle Tiere konnte anhand der Herzaktivitätsmessungen eine negative Belastung durch die experimentelle Prozedur nachgewiesen werden, die bei den angekündigt negativ stimulierten Tieren am geringsten ausfiel.

Offenbar sind Schweine der Deutschen Landrasse sowie ihr Immunsystem robust gegenüber induzierten Stimmungen. Als robust werden Schweine definiert, die sowohl ein hohes Produktionspotential als auch eine große Widerstandskraft gegenüber externen Stressoren besitzen (Knap, 2005). Durch ein hohes Maß an Robustheit ist bei Schweinen ein hohes Produktionspotential bei gleichzeitig auftretender großer Varianz an Umweltbedingungen möglich. Daher bedarf es für die Verminderung der Immunkompetenz sehr starker Stressoren. Der von uns verwendete milde aversive Stimulus reichte nicht aus, um die Immunkompetenz negativ zu beeinflussen.

Schlussfolgernd lässt sich für diese Studie sagen, dass die passive Antizipation eines positiven Stimulus nicht ausreicht, um eine positive Stimmung bei Schweinen zu induzieren und somit ihr Wohlbefinden zu verbessern. Entscheidend für die erfolgreiche Induktion einer positiven Stimmung ist folglich die Kombination einer emotionalen Komponente (positiver Stimulus, Belohnung) mit einer Handlungskomponente, wie es beispielsweise in Studien zur Aufruffütterung von Ernst et al. (2005) und Zebunke et al. (2011, 2013) gezeigt werden konnte. Für zukünftige Untersuchungen wären Ansätze denkbar, die das Spielverhalten der Schweine integrieren und in denen Tiere über operante Verhalten den Erhalt der Belohnung kontrollieren können.

## 5. Zusammenfassung

---

Das Interesse an wohlbefindenssteigernden Maßnahmen im Rahmen der Nutztierhaltung ist innerhalb der letzten Jahre durch ein neues Bewusstsein der Verbraucher gestiegen. Emotionen stehen hierbei im Mittelpunkt zahlreicher Studien, die sich mit dem Wohlbefinden von Tieren beschäftigen. Wie aus Tiersicht auftretende Ereignisse bewertet werden und welche physiologischen Reaktionen diese Bewertung nach sich zieht, ist bisher kaum geklärt. Diese Arbeit soll daher den Einfluss der wiederholten Antizipation von positiven oder negativen Stimuli auf die Immunkompetenz beim Hausschwein (*Sus scrofa domestica*) klären. Durch die wiederholte positive, negative oder konflikthaltige Antizipation sollten Änderungen der Stimmung induziert werden. Im Vergleich zu früheren Studien (Ernst et al., 2005; Zebunke et al., 2011) wurde bewusst auf eine Handlungskomponente verzichtet, um so den Einfluss der passiven Antizipation eines positiven oder negativen Stimulus auf das Wohlbefinden der Tiere zu klären. Der Einfluss der induzierten Stimmungen auf das Immunsystem über das Neuroendokrinum sollte über die Erfassung von Stressmarkern, wie beispielsweise ACTH und Cortisol, von Neurotransmittern und deren Metaboliten sowie über ein breit gefächertes Spektrum an Immunparametern, wie dem Differentialblutbild, Immunglobulin- und Zytokinkonzentrationen, NK-Zellaktivität und Lymphozytenproliferation, untersucht werden.

Als Versuchstiere dienten 96 Ferkel der Deutschen Landrasse in 16 Durchgängen à 30 Tagen und mit je sechs Tieren. Die Schweine wurden restriktiv in sechs Einzelbuchten gehalten. Alle Tiere hörten je Versuchstag sechsmal zu randomisierten Zeitpunkten ein 1-minütiges Tonsignal. Drei der Tiere waren auf diesen Ton konditioniert und erhielten unterschiedliche Behandlungen. Ein Tier erhielt nach dem Ton Futter (Angekündigte Fütterung, AF), eines einen Luftstoß (Angekündigter Luftstoß, AL) und ein weiteres erhielt zufällig Futter oder einen Luftstoß (je dreimal pro Tag; Angekündigter Konflikt, AK). Die anderen beiden Versuchstiere erhielten tonunabhängige Reize. Das eine Tier bekam pro Tag sechsmal unangekündigt Futter (Zufällige Fütterung, ZF) und das andere Tier sechsmal unangekündigt einen Luftstoß (Zufälliger Luftstoß, ZL). Zusätzlich wurde als Kontrolle ein Tier zweimal täglich zu festen Zeiten gefüttert (Feste Fütterung, FF).

Zum Beginn des Versuchs zeigten die Tiere aller Behandlungsgruppen Anzeichen von Stress. Sie wiesen aufgrund des kürzlich erfolgten Absetzens und der experimentellen Prozedur erhöhte ACTH- und Cortisolkonzentrationen sowie ein erhöhtes Verhältnis von Neutrophilen zu Lymphozyten (N/L) auf.

Da am Ende des Versuchs sowohl die ACTH- und Cortisolkonzentrationen als auch das Verhältnis N/L nicht mehr erhöht waren und zudem weder die Genexpression von CRH und GR noch die Morphologie der Nebennieren signifikant verändert waren, ist davon auszugehen, dass die Tiere an die experimentelle Prozedur habituierten und folglich nicht chronisch gestresst waren. Möglicherweise wurde die experimentelle Prozedur von den Tieren jedoch als „belastend“ bewertet, worauf die Verschiebung der autonomen Balance in Richtung sympathische Kontrolle bei allen Behandlungsgruppen hinweist (Mahnhardt, 2015). Zudem konnte für die einen positiven Reiz antizipierenden Tiere (AF) eine verstärkte Erregung durch die Antizipation des Futters anhand des erhöhten Verhältnisses von 5-HIAA zu 5-HT im VTA ermittelt werden. Dies spiegelte sich auch in der zum Ende des Versuchs auftretenden Erhöhung der Basalherzfrequenzen bei den positiv gereizten Tieren wider (Mahnhardt et al., 2014). Die aversiv gereizten Tiere (AL) waren vermutlich auch in einer erregten Stimmung, da sie leicht erhöhte NA-Konzentration im PFC aufwiesen. Die erhöhte NA-Konzentration im PFC ist ein Hinweis auf die Erfahrung eines aversiven Stimulus. Die Konzentrationen von Cortisol, DA sowie von 5-HT blieben unverändert und stützen daher die Annahme einer Dauererregung und der Abwesenheit von chronischem Stress. Die Gruppe AL zeigte, entgegen unseren Erwartungen, im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen die geringste Belastung durch die experimentelle Prozedur, da einerseits die Verschiebung der autonomen Balance in Richtung sympathische Kontrolle deutlich geringer ausfiel und andererseits die Basalherzfrequenz dem Alter der Tiere entsprechend sank (Mahnhardt, 2015).

Die Dauererregung der Tiere durch die experimentelle Prozedur könnte dafür verantwortlich gewesen sein, dass die Lymphozytenproliferation nach Stimulation mit ConA und PHA bei den Tieren aller Behandlungsgruppen am Ende des Versuchs reduziert war. Die Lymphozytenproliferation nach SEB-Stimulation blieb hingegen unverändert.

Entgegen unseren Erwartungen konnte keine Beeinflussung der Immunkompetenz durch die wiederholte Antizipation eines positiven oder negativen Stimulus nachgewiesen werden. Lediglich zu Beginn des Versuchs wurden erhöhte TNF- $\alpha$  und IL-10-Konzentrationen nachgewiesen, die für eine *E. coli*-Infektion bei den Tieren sprechen. Die NK-Zell-Aktivität blieb unverändert, während die Immunglobulinkonzentrationen entwicklungsbedingt zum Ende des Versuchs anstiegen.

Die Antizipation eines positiven Stimulus ohne die Möglichkeit der Kontrolle reicht demnach nicht aus, um eine positive Stimmung zu induzieren und so das Wohlbefinden über eine gesteigerte Immunkompetenz zu verbessern. Der eingesetzte aversive Stimulus war in seiner Intensität nicht stark genug, sodass die Tiere an diesen Reiz habituierten. Hausschweine

besitzen züchtungsbedingt eine große Robustheit gegenüber emotionalen Reizen, wodurch eine erfolgreiche Immunabwehr und somit auch stabile Leistungen in der Produktion gesichert werden.

## 6. Summary

---

The interest in measures enhancing animal welfare in farm animal husbandry has risen by a new awareness of consumers in the last years. Emotions are a central aspect in numerous studies dealing with animal welfare. Little is known about how animals assess events from their point of view and the resulting physiological reactions.

This study aims at elucidating the effects of repeated anticipation of positive or negative stimuli on the immune competence in swine (*Sus scrofa domestica*). We used repeated positive, negative or ambivalent anticipation to induce changes in mood. In comparison to former studies (Ernst et al., 2005; Zebunke et al., 2011) we consciously excluded an active component to find out whether passive anticipation of positive or negative stimuli can influence animal welfare. To analyse the influence of induced moods on the immune system via the neuroendocrine system, we recorded stress markers, such as ACTH and cortisol, plus neurotransmitters and their metabolites and by a broad spectrum of immune parameters such as differential leucocyte count, cytokine and immunoglobulin concentrations, NK cell activity and lymphocyte proliferation.

The experiments were conducted with 96 German Landrace piglets in 16 replicates, lasting for 30 days each. Six female animals were housed in individual pens, which were spatially modifiable, in the same room. All of the six experimental animals heard a one-minute sound signal randomized six times per day. Three of these piglets were conditioned to the sound that was followed either by food (announced food, AF), an air-puff (announced air-puff, AL) or a random choice of food or air-puff (announced conflict, AK). Two other animals received the stimuli independently from the sound signal. One animal received feed six times per day (randomized feeding, ZF), and one an air puff six times per day (randomized air puff, ZL). Furthermore, one animal had fixed feeding times two times per day (fixed feeding, FF; control group).

At the beginning of the experiment the animals of all treatment groups showed signs of stress. They had increased ACTH and cortisol levels as well as an elevated neutrophil/leukocyte ratio probably due to the recent weaning and the experimental procedure

Low values of ACTH and cortisol as well as the N/L ratio, the stable gene expression of CRH and GR and furthermore the unchanged morphology of the adrenal glands at the end of the experiment are evidence for the habituation of the animals to the experimental procedure. Apparently, the animals were not chronically stressed, although they probably experienced a

strain due to the experimental procedure. This is indicated by a shift of the autonomous balance towards sympathetic control, which was found for animals of all treatment groups (Mahnhardt, 2015). In addition, animals anticipating a positive stimulus (AF) exhibited an increased arousal as indicated by the elevated 5-HIAA/5-HT ratio in the VTA. This was confirmed by the investigated increased basal heart rate and sympathetic activation (Mahnhardt et al., 2014). Also the animals anticipating a negative stimulus (AL) were probably aroused, because NA levels in the PFC were slight increased. The increase of NA levels indicates experienced aversive stimuli (Tomie et al. 2004). The concentrations of cortisol, DA and 5-HT stayed unchanged, which justifies the assumption of arousal and the absence of chronic stress. Contrary to our expectations the animals of treatment group AL showed the smallest strain due to the experimental procedure in comparison to all other groups. This was indicated by the clearly smaller shift of autonomous balance towards sympathetic control as well as by the age-related decrease of basal heart rate at the end of the experiment (Mahnhardt, 2015).

The arousal of the animals by the experimental procedure probably influenced the lymphocyte proliferation, so that for all treatment groups the lymphocyte proliferation after ConA and PHA stimulation decreased at the end of the experiment. The lymphocyte proliferation after stimulation with SEB stayed unchanged.

Contrary to our expectations, the immunocompetence was not influenced by the repeated anticipation of neither a positive nor a negative stimulus.

The concentrations of the cytokine TNF- $\alpha$  and IL-10 were increased only at the beginning of the experiment, which argued for an *E. coli* infection in animals. The animals showed no significant changes of NK cell activity. Immunoglobulin concentrations showed an age-related increase at the end of the experiment.

Thus the anticipation of a positive stimulus without the possibility of control is not sufficient to induce positive moods and thereby improve animal welfare due to enhanced immunocompetence. The used aversive stimulus was too weak, so that animals habituated to this stimulus. It seems that domestic pigs are very robust towards emotional stimuli as a result of breeding. This ensures a stable immunocompetence and a high production efficiency.

## Literaturverzeichnis

---

- Aardal-Eriksson E, Karlberg BE, Holm AC (1998) Salivary cortisol--an alternative to serum cortisol determinations in dynamic function tests. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 36(4): 215-222.
- Ableitner M (2009) Untersuchung des CRH/CRH-Rezeptor Systems mit Hilfe Zelltyp-spezifisch CRH-überexprimierender Mauslinien. Dissertation, München.
- Adell A, Garcia-Marquez C, Armario A, Gelpi E (1988a) Chronic stress increases serotonin and noradrenaline in rat brain and sensitizes their responses to a further acute stress. *Journal of neurochemistry* 50(6): 1678-1681.
- Adell A, Trullas R, Gelpi E (1988b) Time course of changes in serotonin and noradrenaline in rat brain after predictable or unpredictable shock. *Brain Research* 459(1): 54-59.
- Ader R, Cohen N, Felten D (1995) Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. *Lancet* 345(8942): 99-103.
- Alpert M, Rosen A (1990) A semantic analysis of the various ways that the terms "affect," "emotion," and "mood" are used. *Journal of Communication Disorders* 23(4-5): 237-246.
- Arnsten AF (2000) Through the looking glass: differential noradrenergic modulation of prefrontal cortical function. *Neural Plasticity* 7(1-2): 133-146.
- Arthur AR (1987) Stress as a state of anticipatory vigilance. *Perceptual and Motor Skills* 64(1): 75-85.
- Ashby FG, Isen AM, Turken AU (1999) A neuropsychological theory of positive affect and its influence on cognition. *Psychological Review* 106(3): 529-550.
- Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS (2000) Glucocorticoids in T cell development and function. *Annual Review of Immunology* 18: 309-345.
- Arya SK, Wong-Staal F, Gallo RC (1984) Dexamethasone-mediated inhibition of human T cell growth factor and gamma-interferon messenger RNA. *Journal of Immunology* 133(1): 273-276.
- Aplin AE, Howe AK, Juliano RL (1999) Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Current Opinion in Cell Biology* 11 (6): 737-744.
- Baldo BA, Kelley AE (2007) Discrete neurochemical coding of distinguishable motivational processes: insights from nucleus accumbens control of feeding. *Psychopharmacology* 191(3): 439-459.
- Bale TL, Vale WW (2004) CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annual review of pharmacology and toxicology* 44: 525-557.
- Barker DJ (1992) The fetal origins of diseases of old age. *European Journal of Clinical Nutrition* 46 Suppl 3: S3-9.
- Barker DJ (2004) Developmental origins of adult health and disease. *Journal of Epidemiology & Community Health*. 58(2): 114-115.
- Barnett JL, Winfield CG, Cronin G M, Makin AW (1981) Effects of photoperiod and feeding on plasma corticosteroid concentrations and maximum corticosteroid-binding capacity in pigs. *Australian Journal of Biological Sciences* 34(5-6): 577-585.

- Barnett JH, Xu K, Heron J, Goldman D, Jones PB (2011) Cognitive effects of genetic variation in monoamine neurotransmitter systems: a population-based study of COMT, MAOA, and 5HTTLPR. *Neuropsychiatric Genetics* 156(2): 158-167.
- Bassett L, Buchanan-Smith HM (2007) Effects of predictability on the welfare of captive animals. *Applied Animal Behaviour Science* 102(3-4): 223-245.
- Bate LA, Hacker RR (1985) Effect of cannulation and environmental temperature on the concentration of serum cortisol in pregnant sows. *Canadian Journal of Animal Science* 65(2): 399-404.
- Becker BA, Nienaber JA, DeShazer JA, Hahn GL (1985) Effect of transportation on cortisol concentrations and on the circadian rhythm of cortisol in gilts. *American Journal of Veterinary Research* 46(7): 1457-1459.
- Benaroya-Milshtein N, Hollander N, Apter A, Kukulansky T, Raz N, Wilf A, Yaniv I, Pick CG (2004) Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *European Journal of Neuroscience* 20(5): 1341-1347.
- Berridge KC (2007) The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology* 191(3): 391-431.
- Besedovsky HO, del Rey A (2002) Introduction: immune-neuroendocrine network. *Frontiers of Hormone Research* 29: 1-14.
- Besedovsky H, Sorkin E (1977) Network of immune-neuroendocrine interactions. *Clinical and Experimental Immunology* 27(1): 1-12.
- Beutler B (2004) Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology* 40(12): 845-859.
- Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, Oksenberg J, McNicholl J, Pociot F, Hardt C, D'Alfonso S (1999) Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes and Immunity* 1(1): 3-19.
- Blalock JE (1989) A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiological Reviews* 69(1): 1-32.
- Blanchard DC, Sakai RR, McEwen B, Weiss SM, Blanchard RJ (1993) Subordination stress: behavioral, brain, and neuroendocrine correlates. *Behavioural Brain Research* 58(1-2): 113-121.
- Boissy A, Manteuffel G, Bak Jensen M, Oppermann Moed R, Spruijite B, Keeling LJ, Winckler C, Forkman B, Dimitrovi I, Langbein J, Bakkenj M, Veissiera I, Aubert A (2007) Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. *Physiology & Behavior* 92(3): 375-397.
- Boumpas DT, Older SA, Anastassiou ED, Tsokos GC, Nelson D, Balow JE (1991) Dexamethasone inhibits human IL-2 but not IL-2R gene expression in vitro at the level of nuclear transcription. *The Journal of Clinical Investigation* 87(5): 1739-1747.
- Bourne FJ (1973) The immunoglobulin system of the suckling pig (Symposium on 'Nutrition of the Young Farm Animal'). *Proceedings of the Nutrition Society* 32(3): 205-215.
- Bowman RE, MacLusky NJ, Sarmiento Y, Frankfurt M, Gordon M, Luine VN (2004) Sexually dimorphic effects of prenatal stress on cognition, hormonal responses, and central neurotransmitters. *Endocrinology* 145(8):3778-3787.
- Broom DM (1991) Animal-welfare - Concepts and measurement. *Journal of Animal Science* 69(10): 4167-4175.

- Cabib S, Puglisi-Allegra S (2012) The mesoaccumbens dopamine in coping with stress. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 36(1): 79-89.
- Calixto C, Martinez FE, Jorge SM, Moreira AC, Martinelli CE Jr (2002) Correlation between plasma and salivary cortisol levels in preterm infants. *The Journal of Pediatrics* 140(1): 116-118.
- Cannon WB (1929) Organization for physiological homeostasis. *Physiological Reviews* 9(3): 399-431.
- Cao L, Liu X, Lin EJ, Wang C, Choi EY, Riban V, Lin B, During MJ (2010) Environmental and genetic activation of a brain-adipocyte BDNF/leptin axis causes cancer remission and inhibition. *Cell* 142(1): 52-64.
- Chmielowiec-Korzeniowska A, Leszek T, Marek B, Ewa S (2013) Selected hematological and immunological parameters in pigs transferred from the rearing unit to the finishing house. *African Journal of Biotechnology* 12(34): 5258-5266.
- Clark LS, Cowan DF, Pfeiffer DC (2006) Morphological changes in the Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) adrenal gland associated with chronic stress. *Journal of Comparative Pathology* 135(4): 208-216.
- Clore GL (1994). Why emotions are never unconscious. In: Ekman P, Davidson RJ (Hrsg.) *The nature of emotion*. New York: Oxford University Press.
- Cook NJ, Schaefer AL, Lepage P, Morgan Jones S (1996) Salivary vs. serum cortisol for the assessment of adrenal activity in swine. *Canadian Journal of Animal Science* 76(3): 329-335.
- Cools R, Nakamura K, Daw ND (2011) Serotonin and dopamine: unifying affective, activational, and decision functions. *Neuropsychopharmacology* 36(1): 98-113.
- Coppin H, Roth MP, Liblau RS (2003) Cytokine and cytokine receptor genes in the susceptibility and resistance to organ-specific autoimmune diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 520: 33-65.
- Cordero M, Brorsen BW, 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.
- Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F, Weissmann G (1992) A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intracellular adhesion molecule 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(21): 9991-9995.
- Curtis J, Bourne FJ (1971) Immunoglobulin quantitation in sow serum colostrum and milk and the serum of young pigs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* Volume 236(1): 319-332.
- Cui TP, Wu JM, Pan SX, Xie JG (2003) Polymorphisms in the IL-4 and IL-4R alpha genes and allergic asthma. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 41(7): 888-892.
- D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G (1993) Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma- production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *The Journal of Experimental Medicine* 178(3): 1041-1048.
- Dantzer R (2001) Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain, Behavior, and Immunity* 15(1): 7-24

- Dantzer R (2002) Can farm animal welfare be understood without taking into account the issues of emotion and cognition? *Journal of Animal Science* 80 (E. Suppl. 1): E1-E9.
- Davis AK, Maney DL, März JC (2008) The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology* 22(5): 760-772.
- Dawkins MS (1990) From an animals point of view – Motivation, fitness, and animal welfare. *Behavioral and Brain Sciences* 13(1): 1-9.
- de Groot J, Kruijt L, Scholten JW, Boersma WJ, Buist WG, Engel B, van Reenen CG (2005) Age, gender and litter-related variation in T-lymphocyte cytokine production in young pigs. *Immunology* 115(4): 495-505.
- Delves PJ, Roitt IM (2000) The immune system. First of two parts. *The New England Journal of Medicine* 343(1): 37-49.
- Désiré L, Boissy A, Veissier I (2002) Emotions in farm animals: a new approach to animal welfare in applied ethology. *Behavioural processes* 60(2): 165-180.
- Deutch AY, Roth RH (1990) The determinants of stress-induced activation of the prefrontal cortical dopamine system. *Progress in Brain Research* 85: 367-403.
- Dhabhar FS (2000) Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity. The role of stress hormones and leukocyte trafficking. *Annals of the New York Academy of Sciences* 917: 876-893.
- Dhabhar FS (2002) Stress-induced augmentation of immune function—The role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain, Behavior, and Immunity* 16(6): 785-798.
- Dhabhar FS (2009) Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: Implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation* 16(5): 300-317.
- Dhabhar FS (2014) Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunologic Research* 58(2-3): 193-210.
- Dhabhar FS, McEwen BS (1997) Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain, Behavior, and Immunity* 11(4): 286-306.
- Dudink S, Simons H, Marks I, de Jonge FH, Spruijt BM (2006) Announcing the arrival of enrichment increases play behaviour and reduces weaning-stress-induced behaviours of piglets directly after weaning. *Applied Animal Behaviour Science* 101(1-2): 86-101.
- Douglas C, Bateson M, Walsh C, Bédélec A, Edwards SA (2012) Environmental enrichment induces optimistic cognitive biases in pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 139(1-2): 65-73.
- Duncan IJH (2006) The changing concept of animal sentience. *Applied Animal Behaviour Science* 100 (1-2): 11-19.
- Düppan S, Schön PC, Puppe B, Tuchscherer A, Manteuffel G (2008) Differential vocal responses to physical and mental stressors in domestic pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 114(1-2): 105-115.
- Dyke SM, Carey BS, Kaminski ER (2008) Effect of stress on basophil function in chronic idiopathic urticarial. *Clinical and Experimental Allergy* 38(1): 86-92.
- Eckart C, Bunzeck N (2013) Dopamine modulates processing speed in the human mesolimbic system. *NeuroImage* 66: 293-300.

- Edfors-Lilja I, Bergstrom M, Gustafsson U, Magnusson U, Fossum C (1991) Genetic variation in ConA-induced production of interleukin 2 by porcine peripheral blood mononuclear cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 27(4): 351-363.
- Eich KO, Schmidt U, unter Mitarbeit von de Jong M (1998) *Handbuch Schweinekrankheiten*. 4. Auflage, Münster-Hiltrup, Landschaftsverlag S. 178-181.
- Ekkel ED, Dieleman SJ, Schouten WG, Portela A, Cornélissen G, Tielen MJ, Halberg F (1996) The circadian rhythm of cortisol in the saliva of young pigs. *Physiology & Behavior* 60(3): 985-989.
- Ekkel ED, Savenije B, Schouten WG, Wiegant VM, Tielen MJ (1997) The effects of mixing upon behaviour and circadian parameters of salivary cortisol in pigs. *Physiology & Behavior* 62(1): 181-184.
- Ekman P (1999). Basic Emotions. In: Dalgleish T, Power MJ (Hrsg.), *The handbook of cognition and emotion*, Hillsdale, NJ: Erlbaum, S. 45-60.
- Elenkov IJ, Chrousos GP (1999) Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 10(9): 359-368.
- Engeland WC, Shinsako J, Winget CM, Vernikos-Danellis J, Dallman MF (1977) Circadian patterns of stress-induced ACTH secretion are modified by corticosterone responses. *Endocrinology* 100(1): 138-47.
- Ernst K, Puppe B, Schon PC, Manteuffel G (2005) A complex automatic feeding system for pigs aimed to induce successful behavioural coping by cognitive adaptation. *Applied Animal Behaviour Science* 91 (3-4): 205-218.
- Ernst K, Tuchscherer M, Kanitz E, Puppe B, Manteuffel G (2006) Effects of attention and rewarded activity on immune parameters and wound healing in pigs. *Physiology & Behavior* 9(3): 448-456.
- Evans FD, Christopherson RJ, Aherne FX (1988) Development of the circadian rhythm of cortisol in the gilt from weaning until puberty. *Canadian Journal of Animal Science* 68(4): 1105-1111.
- Faustini M, Munari E, Colombani C, Russo V, Maffeo G, Vigo D. (2000) Haematology and plasma biochemistry of Stamboek pre pubertal gilts in Italy: reference values. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine* 47(9): 525-532.
- Felten SY, Felten DL (1991) The innervation of lymphoid tissue. In: Ader R, Cohen N, Felten DL (Hrsg.) *Psychoneuroimmunology*, 2. Auflage, New York: Academic S. 27-70.
- Felten DL, Cohen N, Ader R (1991) Central neural circuits involved in neural-immune interactions. In: Ader R, Cohen N, Felten DL (Hrsg.) *Psychoneuroimmunology*, 2. Auflage, New York: Academic S. 3-25.
- Fleischatlas (2014) *Daten und Fakten über Tiere als Nahrungsmittel*. Heinrich-Böll-Stiftung, Bund für Umwelt- und Naturschutz Deutschland und Le Monde diplomatique.
- Fletcher PC, Henson RN (2001) Frontal lobes and human memory: insights from functional neuroimaging. *Brain* 124(Pt 5):849-881.
- Friendship RM, Lumsden JH, McMillan I, Wilson MR (1984) Hematology and biochemistry reference values for Ontario swine. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 48(4): 390-393.

- Gesing A, Bilanz-Bleuel A, Droste SK, Linthorst AC, Holsboer F, Reul JM (2001) Psychological stress increases hippocampal mineralocorticoid receptor levels: involvement of corticotropin-releasing hormone. *The Journal of Neuroscience* 21(13): 4822-4829.
- Gianferante D, Thoma MV, Hanlin L, Chen X, Breines JG, Zoccola PM, Rohleder N (2014) Post-stress rumination predicts HPA axis responses to repeated acute stress. *Psychoneuroendocrinology* 49: 244-252.
- Gillis S, Crabtree GR, Smith KA (1979) Glucocorticoid-Induced Inhibition of T Cell Growth Factor Production. I. The Effect on Mitogen-Induced Lymphocyte Proliferation. *Journal of Immunology* 123(4): 1624-1631.
- Glaser R, MacCallum RC, Laskowski BF, Malarkey WB, Sheridan JF, Kiecolt-Glaser JK (2001) Evidence for a shift in the Th-1 to Th-2 cytokine response associated with chronic stress and aging. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 56(8): M477-482.
- Glaser R und Kiecolt-Glaser JK (2005) Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nature Reviews Immunology* 5(3): 243-251.
- Gozansky WS, Lynn JS, Laudenslager ML, Kohrt WM (2005) Salivary cortisol determined by enzyme immunoassay is preferable to serum total cortisol for assessment of dynamic hypothalamic--pituitary--adrenal axis activity. *Clinical Endocrinology* 63(3): 336-341.
- Griffith MK, Minton JE (1991) Free-running rhythms of adrenocorticotrophic hormone (ACTH), cortisol and melatonin in pigs. *Domestic Animal Endocrinology* 8(2): 201-208.
- Gourkow N, Phillips CJ (2015) Effect of interactions with humans on behaviour, mucosal immunity and upper respiratory disease of shelter cats rated as contented on arrival. *Preventive Veterinary Medicine* 121(3-4): 288-296.
- Grün V, Schmucker S, Schalk C, Flauger B, Weiler U, Stefanski V (2013) Influence of Different Housing Systems on Distribution, Function and Mitogen-Response of Leukocytes in Pregnant Sows. *Animals, open access journal* 3(4): 1123-1141.
- Grün V, Schmucker S, Schalk C, Flauger B, Stefanski V (2014) Characterization of the adaptive immune response following immunization in pregnant sows (*Sus scrofa*) kept in two different housing systems. *Journal of Animal Science* 92(8): 3388-3397.
- Gross WB und Siegel HS (1983) Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Diseases* 27(4): 972-979.
- Habe F (1974) Die quantitativen Veränderungen der Immunglobuline im Blutserum der Ferkel bei verschiedenen Aufzuchtverfahren. Dissertation, Gießen.
- Hall JG, Morris B (1965) The immediate effect of antigens on the cell output of a lymph node. *British Journal of Experimental Pathology* 46(4): 450-454.
- Hart BL (1988) Biological basis of the behavior of sick animals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 12(2): 123-137.
- Hausmann MF, Carroll JA, Weesner GD, Daniels MJ, Matteri RL, Lay DC Jr (2000) Administration of ACTH to restrained, pregnant sows alters their pigs' hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Journal of Animal Science* 78(9): 2399-2411.
- Hayley S, Borowski T, Merali Z, Anisman H (2001) Central monoamine activity in genetically distinct strains of mice following a psychogenic stressor: effects of predator exposure. *Brain Research* 892(2): 293-300.

- Heinritzi K, Plonait H (2001) Blutkrankheiten. Pathophysiologie und Diagnostik In: Waldmann KH, Wendt M (Hrsg.) Lehrbuch der Schweinekrankheiten 3. Auflage, Berlin Parey Verlag S. 174-175.
- Hemsworth PH (2007) Ethical stockmanship. *Australian Veterinary Journal* 85(5): 194-200.
- Hennessy MB, Deak T, Schiml-Webb PA (2001) Stress-induced sickness behaviors: an alternative hypothesis for responses during maternal separation. *Developmental Psychobiology* 39(2): 76-83.
- Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H (2005) Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 29(8): 1201-1213.
- Hessle C, Hanson LA, Wold AE (2000) Interleukin-10 produced by the innate immune system masks in vitro evidence of acquired T-cell immunity to *E. coli*. *Scandinavian Journal of Immunology* 52(1): 13-20.
- Hicks TA, McGlone JJ, Whisnant SC, Kattesh HG, Norman RL (1998) Behavioral, endocrine, immune, and performance measures for pigs exposed to acute stress. *Journal of Animal Science* 76(2): 474-483.
- Hornung JP (2003) The human raphe nuclei and the serotonergic system. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 26(4): 331-343.
- Hucklebridge F, Lambert S, Clow A, Warburton DM, Evans PD, Sherwood N (2000) Modulation of secretory immunoglobulin A in saliva; response to manipulation of mood. *Biological Psychology* 53(1): 25-35.
- Hughes BO, Duncan IJH (1988) The notion of ethological need, models of motivation and animal-welfare. *Animal Behaviour* 36(6): 1696-1707.
- Huot RL, Plotsky PM, Lennox RH, McNamara RK (2002) Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Research* 950(1-2): 52-63.
- Hutson GD, Dickenson LG, Wilkinson JL, Luxford BG (1993): The response of sows to novel visual, olfactory, auditory and tactile stimuli. *Applied Animal Behaviour Science* 35(3): 255-266.
- Imfeld-Mueller S, Van Wezemael L, Stauffacher M, Gygax L, Hillmann E (2011) Do pigs distinguish between situations of different emotional valences during anticipation? *Applied Animal Behaviour Science* 131(3-4): 86-93.
- Imperato A, Angelucci L, Casolini P, Zocchi A, Puglisi-Allegra S (1992) Repeated stressful experiences differently affect limbic dopamine release during and following stress. *Brain Research*. 577(2): 194-199.
- Irwin MR, Hauger RL (1988) Adaptation to chronic stress. Temporal pattern of immune and neuroendocrine correlates. *Neuropsychopharmacology* 1(3): 239-242.
- Ivanova EA, Orekhov AN (2015) T Helper Lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer: An Overview. *BioMed Research International* [electronic resource] Volume 2015, Article ID 327470, 9 Seiten.
- Janssens CJ, Helmond FA, Wiegant VM (1995) The effect of chronic stress on plasma cortisol concentrations in cyclic female pigs depends on the time of day. *Domestic Animal Endocrinology* 12 (2): 167-177.

- Jemmott JB 3rd, Borysenko JZ, Borysenko M, McClelland DC, Chapman R, Meyer D, Benson H (1983) Academic stress, power motivation, and decrease in secretion rate of salivary secretory immunoglobulin A. *Lancet* 1(8339): 1400-1402.
- Jensen PT, Christensen K (1981) Genetic studies on the in vitro PHA-transformation of porcine blood lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2(2): 133-143.
- Jensen P, Toates FM (1993) Who needs 'behavioral needs'? Motivational aspects of the needs of animals. *Applied Animal Behaviour Science* 37(2): 161-181.
- Joling P, Wever PJM, Oskam JPH, Henken AM (1993) Lymphocyte stimulation by phytohemagglutinin and concanavalin-A in different swine breeds. *Livestock Production Science* 35(3-4): 341-350.
- Kanitz E, Otten W, Tuchscherer M, Manteuffel G (2003) Effects of prenatal stress on corticosteroid receptors and monoamine concentrations in limbic areas of suckling piglets (*Sus scrofa*) at different ages. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine* 50(3): 132-139.
- Kanitz E, Tuchscherer M, Puppe B, Tuchscherer A, Stabenow B (2004): Consequences of repeated early isolation in domestic piglets (*Sus scrofa*) on their behavioural, neuroendocrine, and immunological responses. *Brain, Behavior, and Immunity* 18(1): 35-45.
- Kanitz E, Otten W, Tuchscherer M (2006) Changes in endocrine and neurochemical profiles in neonatal pigs prenatally exposed to increased maternal cortisol. *The Journal of Endocrinology* 191(1): 207-220.
- Kanitz E, Otten W, Hameister T, Tuchscherer M, Puppe B, Tuchscherer A (2011) Age-related changes in corticosteroid receptor expression and monoamine neurotransmitter concentrations in various brain regions of postnatal pigs. *Journal of Neuroscience Research* 89(7): 1134-1141.
- Kattesh HG, Charles SF, Baumbach GA, Gillespie BE (1990) Plasma cortisol distribution in the pig from birth to six weeks of age. *Biology of the Neonate*. 58(4): 220-226.
- Kelm SC, Freeman AE, Kehrli ME (2001) Genetic control of disease resistance and immunoresponsiveness. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 17(3): 477-493.
- Kennedy M (2010) A Brief Review of the Basics of Immunology: The Innate and Adaptive Response. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 40(3): 369-379.
- Kerr AC (1956) The effect of mental stress on the eosinophil leucocyte count in man. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences* 41(1): 18-24.
- Kixmüller M (2004) Labordiagnostische Referenzbereiche bei unterschiedlichen Schweinerassen sowie histopathologische und immunohistochemische Untersuchung von Gehirnen älterer Sauen und Eber auf transmissible spongiforme Enzephalopathie im Rahmen der TSE-Studie. Dissertation, München.
- Klemcke HG, Nienaber JA, Hahn GL (1989) Plasma adrenocorticotrophic hormone and cortisol in pigs: Effects of time of day on basal and stressor-altered concentrations. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 190(1): 42-53.
- Koolhaas JM, de Boer SF, Buwalda B, van Reenen K (2007) Individual variation in coping with stress: a multidimensional approach of ultimate and proximate mechanisms. *Brain, Behavior and Evolution* 70(4): 218-226.
- Korte SM, Olivier B, Koolhaas JM (2007) A new animal welfare concept based on allostasis. *Physiology & Behavior* 92 (3): 422-428.

- Kraft W, U.M. Dürr UM, Fürll M, Bostedt H, Heinritzi K (1999) Hämatologie In: Kraft W, Dürr UM (Hrsg.): Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin 5. Auflage, Stuttgart, New York, Schattauer Verlag S. 43-77.
- Kraft W und Dürr UM (2005) Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. 6. Auflage, Stuttgart, New York, Schattauer Verlag S. 509-513.
- Kranz GS, Kasper S, Lanzenberger R (2010) Reward and the serotonergic system. *Neuroscience* 166(4): 1023-1035.
- Kotb M (1995) Bacterial Pyrogenic Exotoxins as Superantigens. *Clinical Microbiology Reviews* 8(3): 411-426.
- Kristensen F, Kristensen B, Lazary S (1982) The lymphocyte stimulation test in veterinary immunology. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 3(1-2): 203-277.
- Lansade L, Simone F (2010) Horses' learning performances are under the influence of several temperamental dimensions. *Applied Animal Behaviour Science* 125(1-2): 30-37.
- Lazarus RS (1974) Psychological stress and coping in adaptation and illness. *International Journal of Psychiatry in Medicine* 5(4): 321-333.
- Lazarus RS (1994). 'Psychological stress in the workplace', In: Crandall R, Perrewe PL (Hrsg.): *Occupational Stress: A Handbook*, New York, Taylor and Francis.
- Lee MS, Rim YH, Jcong DM, Kim MK, Joo MC, Shin SH (2005) Nonlinear analysis of heart rate variability during Qi therapy (External Qigong). *American Journal of Chinese Medicine* 33(4): 579-588.
- LeMay LG, Vander AJ, Kluger MJ (1990) The effects of psychological stress on plasma interleukin-6 activity in rats. *Physiology & Behavior* 47(5): 957-961.
- Levast B, Berri M, Wilson HL, Meurens F, Salmon H (2014) Development of gut immunoglobulin A production in piglet in response to innate and environmental factors. *Developmental and Comparative Immunology* 44 (1): 235-244.
- Lewis JG, Bagley CJ, Elder PA, Bachmann AW, Torpy DJ (2005) Plasma free cortisol fraction reflects levels of functioning corticosteroid-binding globulin. *Clinica Chimica Acta* 359(1-2): 189-194.
- Lumsden JH, Mullen K (1978) On establishing reference values. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 42(3): 293-301.
- Lupien SJ, McEwen BS (1997) The acute effects of corticosteroids on cognition: Integration of animal and human model studies. *Brain Research. Brain Research Reviews* 24(1): 1-27.
- Mahnhardt S, Brietzke J, Kanitz E, Schön PC, Tuchscherer A, Gimsa U, Manteuffel G (2014) Anticipation and frequency of feeding affect heart reactions in domestic pigs. *Journal of Animal Science* 92(11): 4878-4887.
- Mahnhardt S (2015) Erfassung der affektiven Herzaktivität und des Verhaltens beim Hausschwein (*Sus scrofa domestica*) in einem emotional wirksamen Antizipationsparadigma. Dissertation, Rostock.
- Manteuffel C, Tuchscherer A, Schmidt M, Hoffmann G, Schön PC (2014) Using air-blow and floor vibration to trigger posture changes in gestating and lactating sows. *Computers and Electronics in Agriculture* 104: 105-110.
- Mason JW (1971) A re-evaluation of the concept of "non-specificity" in stress theory. *Journal of Psychiatric Research* 8(3): 323-333.

- Matsunaga M, Isowa T, Kimura K, Miyakoshi M, Kanayama N, Murakami H, Sato S, Konagaya T, Nogimori T, Fukuyama S, Shinoda J, Yamada J, Ohira H (2008) Associations among central nervous, endocrine, and immune activities when positive emotions are elicited by looking at a favorite person. *Brain, Behavior, and Immunity* 22(3): 408-417.
- Matheson SM, Asher L, Bateson M (2008) Larger, enriched cages are associated with 'optimistic' response biases in captive European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Applied Animal Behaviour Science* 109(2-4): 374-383.
- Mathur RB, Sachdev JC (1958) Mental stress and eosinophil counts. *Indian Journal of Psychology* 2(2): 381-386.
- Matteri RL, Klir JJ, Fink BN, Johnson RW (1998) Neuroendocrine-immune interactions in the neonate. *Domestic Animal Endocrinology* 15(5): 397-407.
- McEwen BS, Sapolsky RM (1995) Stress and cognitive function. *Current Opinion in Neurobiology* 5(2): 205-216.
- McGlone JJ, Lumpkin EA, Norman RL (1991) Adrenocorticotropin stimulates natural killer cell activity. *Endocrinology* 129(3): 1653-1658.
- McGlone JJ, Salak JL, Lumpkin EA, Nicholson RI, Gibson M, Norman RL (1993) Shipping stress and social status effects on pig performance, plasma cortisol, natural killer cell activity, and leukocyte numbers. *Journal of Animal Science*, 71(4): 888-896.
- Meagher R, Mason GJ (2012) Environmental enrichment reduces signs of boredom in caged mink. *PLOS ONE* 7(11): 1-10.
- Medzhitov R, Janeway C Jr (2000) Innate immunity. *The New England journal of medicine* 343(5): 338-344.
- Mendl M, Paul ES (2004) Consciousness, emotion and animal welfare: insights from cognitive science. *Animal Welfare* 13: S17-S25.
- Mendl M, Burman OH, Parker RM, Paul ES (2009) Cognitive bias as an indicator of animal emotion and welfare: Emerging evidence and underlying mechanisms. *Applied Animal Behaviour Science* 118(3-4): 161-181.
- Meyer VJ, Lee Y, Böttger C, Leonbacher U, Allison AL, Shirtcliff EA (2015) Experience, cortisol reactivity, and the coordination of emotional responses to skydiving. *Frontiers in Human Neuroscience* doi 10.3389, 9(138): 1-8.
- Milligan ED, Nguyen KT, Deak T, Hinde JL, Fleshner M, Watkins LR, Maier SF (1998). The long term acute phase-like responses that follow acute stressor exposure are blocked by alpha-melanocyte stimulating hormone. *Brain Research* 810(1-2): 48-58.
- Mitchell RL, Phillips LH (2007) The psychological, neurochemical and functional neuroanatomical mediators of the effects of positive and negative mood on executive functions. *Neuropsychologia* 45(4): 617-629.
- Mittwoch-Jaffe T, Shalit F, Srendi B, Yehuda S (1995) Modification of cytokine secretion following mild emotional stimuli. *Neuroreport* 27;6(5): 789-792.
- Miyazaki K, Miyazaki KW, Doya K (2012) The role of serotonin in the regulation of patience and impulsivity. *Molecular Neurobiology* 45(2): 213-224
- Mond JJ, Lees A, Snapper CM (1995) T-cell independent antigens type 2. *Annual review of immunology*. 13: 655-692.
- Moreraft RJ, Yeterian EH (2002) PFC. In: Ramchandaran VS, editor. *Encyclopedia of human brain*. USA: Academic Press S. 11-26.

- Mormede P, Foury A, Barat P, Corcuff JB, Terenina E, Marissal-Arvy N, Moisan MP (2011) Molecular genetics of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and function. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1220: 127-136.
- Muzio N, Polentarutti N, Bosisio D, Prahlada MKP, Mantovani A (2000) Toll-like receptors: a growing family of immune receptors that are differentially expressed and regulated by different leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology*. 67(4): 450-456.
- Moya SL, Boyle LA, Lynch PB, Arkins S (2007) Age-related changes in pro-inflammatory cytokines, acute phase proteins and cortisol concentrations in neonatal piglets. *Neonatology* 91(1):44-48.
- Nakagawa M, Bondy GP, Waisman D, Minshall D, Hogg JC, van Eeden SF (1999) The effect of glucocorticoids on the expression of L-selectin on polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 93(8): 2730-2737.
- Napolitano F, Girolami A, Braghieri A (2010) Consumer liking and willingness to pay for high welfare animal-based products. *Trends in Food Science & Technology* 21(11): 537-543.
- Nerbas E (2008) Aktualisierung von Blutparametern beim Schwein. Dissertation, Hannover.
- Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, Levin M (1996) A mutation in the interferon-gamma-receptor and susceptibility to mycobacterial infection. *The New England Journal of Medicine* 26: 335(26): 1941-1949.
- Niepage H (1989) Methoden der praktischen Hämatologie für Tierärzte. 2. Auflage, neubearb, Berlin, Hamburg, Parey Verlag.
- Nieters A, Linseisen J, Becker N (2004) Association of polymorphisms in Th1, Th2 cytokine genes with hayfever and atopy in a subsample of EPIC-Heidelberg. *Clinical and Experimental Allergy* 34(3): 346-353.
- Nisenbaum LK, Zigmond MJ, Sved AF, Abercrombie ED (1991) Prior exposure to chronic stress results in enhanced synthesis and release of hippocampal norepinephrine in response to a novel stressor. *The Journal of Neuroscience* 11(5): 1478-1484.
- Oitzl MS, van Haarst AD, Sutanto W, de Kloet ER (1995) Corticosterone, brain mineralocorticoid receptors (MRs) and the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis: the Lewis rat as an example of increased central MR capacity and a hyporesponsive HPA axis. *Psychoneuroendocrinology* 20(6): 655-675.
- Otten W, Kanitz E, Tuchscherer M (2000) Prenatal stress in pigs: effects on growth, physiological stress reactions and immune function. *Archiv Tierzucht, Archive Animal Breed, Dummerstorf* 43(Sonderheft): 159-164.
- Otten W, Kanitz E, Tuchscherer M, Nurnberg G (2001) Effects of prenatal restraint stress on hypothalamic-pituitary-adrenocortical and sympatho-adrenomedullary axis in neonatal pigs. *Animal Science* 2001 73: 279-287.
- Otten W, Kanitz E, Couret D, Veissier I, Prunier A, Merlot E (2010) Maternal social stress during late pregnancy affects hypothalamic-pituitary-adrenal function and brain neurotransmitter systems in pig offspring. *Domestic Animal Endocrinology* 38(3): 146-156.
- Paliogianni F, Ahuja SS, Balow JP, Balow JE, Boumpas DT (1993) Novel mechanism for inhibition of T cells by glucocorticoids (GC): GC modulate signal transduction through IL-2 receptor. *The Journal of Immunology* 151(8): 4081-4089.
- Parkin J, Cohen B (2001) An overview of the immune system. *Lancet* 357(9270): 1777-1789.

- Perretti M, Croxtall JD, Wheller SK, Goulding NJ, Hannon R, Flower RJ (1996) Mobilizing lipocortin 1 in adherent human leukocytes downregulates their transmigration. *Nature Medicine* 2(11): 1259-1262.
- Paul ES, Harding EJ, Mendl M (2005) Measuring emotional processes in animals: the utility of a cognitive approach. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29(3): 469-491.
- Pie S, Lalles JP, Blazy F, Laffitte J, Seve B, Oswald IP (2004) Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *The Journal of Nutrition* 134(3): 641-647.
- Piriou L, Chilmonczyk S, Genetet N, Albina E (2000) Design of a flow cytometric assay for the determination of natural killer and cytotoxic T-lymphocyte activity in human and in different animal species. *Cytometry* 41(4): 289-297.
- Porter P, Hill IR (1970) Serological changes in immunoglobulins IgG, IgA and IgM and *Escherichia coli* antibodies in the young pig. *Immunology* 18(4): 565-573.
- Posner J, Russell JA, Peterson BS (2005) The circumplex model of affect: An integrative approach to affective neuroscience, cognitive development, and psychopathology. *Development and Psychopathology* 17(3): 715-734.
- Puglisi-Allegra S, Andolina D (2015) Serotonin and stress coping. *Behavioural Brain Research*. 277: 58-67.
- Puppe B (2003) Stressbewältigung und Wohlbefinden - verhaltensphysiologische Ansatzpunkte einer Gesundheitssicherung bei Tieren. *Archiv Tierzucht, Archive Animal Breeding, Dummerstorf* 46 (Sonderheft): 52-56.
- Randolph GJ, Jakubzick C, Qu C (2008) Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Current Opinion in Immunology* 20(1): 52-60.
- Ratka A, Sutanto W, Bloemers M, de Kloet ER (1989) On the role of brain mineralocorticoid (type I) and glucocorticoid (type II) receptors in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* 50(2): 117-123.
- Raymond CR, Wilkie BN (2004) Th-1/Th-2 type cytokine profiles of pig T-cells cultured with antigen-treated monocyte-derived dendritic cells. *Vaccine* 22(8): 1016-1023.
- Reddy NR, Borgs P, Wilkie BN (2000) Cytokine mRNA expression in leukocytes of efferent lymph from stimulated lymph nodes in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 74(1-2): 31-46.
- Reul J, de Kloet E (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117 (6): 2505-2512.
- Rhind SM, Rae MT, Brooks AN (2003) Environmental influences on the fetus and neonate--timing, mechanisms of action and effects on subsequent adult function. *Domestic Animal Endocrinology* 25(1): 3-11.
- Roitt IM (1988) Grundlagen der Immunologie – Erworbene spezifische Immunität In: Leitfaden der Immunologie. 3. Auflage, Steinkopff Verlag GmbH & Co. KG, Darmstadt, S. 15-29.
- Rousset F, Garcia E, Defrance T, Péronne C, Vezzio N, Hsu DH, Kastelein R, Moore KW, Banchereau J (1992) Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(5): 1890-1893.
- Rozen S, Skaletsky H (1998) Primer3  
[http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi).

- Russo SJ, Nestler EJ (2013) The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature reviews. Neuroscience*. 14(9): 609-625.
- Salamone JD, Correa M, Farrar A, Mingote SM (2007) Effort-related functions of nucleus accumbens dopamine and associated forebrain circuits. *Psychopharmacology* 191(3): 461-482.
- Salvadori F, Tournefier A (1996) Activation by mitogens and superantigens of axolotl lymphocytes: functional characterization and ontogenic study. *Immunology* 88(4): 586-592.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews* 21(1): 55-89.
- Sautron V, Terenina E, Gress L, Lippi Y1, Billon Y, Larzul C, Liaubet L, Villa-Vialaneix N, Mormède P (2015) Time course of the response to ACTH in pig: biological and transcriptomic study. *BMC genomics [electronic resource]* 16(1): 961; 17 Seiten.
- Schlesinger M, Yodfat Y (1991) The impact of stressful life events on natural killer cells. *Stress Medicine* 7(1): 53-60.
- Schultz W (1997) Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology* 7(2): 191-197.
- Schulz KH, Heesen C, Gold SM (2005) Das Stresskonzept von Allostase und Allostatic Load: Einordnung psychoneuroimmunologischer Forschungsbefunde an Beispielen zur Autoimmunität und Onkologie. *Psychotherapie, Psychosomatik, medizinische Psychologie* 55(11): 452-461.
- Seligman ME, Meyer B (1970) Chronic fear and ulcers in rats as a function of the unpredictability of safety. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 73(2): 202-207.
- Selye H (1973). The evolution of the stress concept. *American Scientist* 61: 692-699.
- Shannon NJ, Gunnet JW, Moore KE (1986) A Comparison of Biochemical Indices of 5-Hydroxytryptaminergic Neuronal Activity Following Electrical Stimulation of the Dorsal Raphe Nucleus. *Journal of Neurochemistry* 47(3): 958-965.
- Silberman DM, Wald MR, Genaro AM (2003) Acute and chronic stress exert opposing effects on antibody responses associated with changes in stress hormone regulation of T-lymphocyte reactivity. *Journal of Neuroimmunology* 144(1-2): 53-60.
- Skidmore BJ, Chiller JM, Morrison DC, Weigle WO (1975) Immunologic properties of bacterial lipopolysaccharide (LPS): correlation between the mitogenic, adjuvant, and immunogenic activities. *Journal of Immunology* 114(2 pt 2): 770-775.
- Staros EB (2005) Innate immunity: New approaches to understanding its clinical significance. *American Journal of Clinical Pathology* 123(2): 305-312.
- Stefanski V (1998) Social stress in loser rats: opposite immunological effects in submissive and subdominant males. *Physiology & Behavior* 63(4): 605-613.
- Stefanski V (2001) Social stress in laboratory rats: behavior, immune function, and tumor metastasis. *Physiology & Behavior* 73(3): 385-391.
- Stefanski V, Knopf G, Schulz S (2001) Long-term colony housing in Long Evans rats: Immunological, hormonal, and behavioral consequences. *Journal of Neuroimmunology* 114(1-2): 122-130.

- Stefanski V, Raabe C, Schulte M (2005) Pregnancy and social stress in female rats: Influences on blood leukocytes and corticosterone concentrations. *Journal of Neuroimmunology* 162(1-2): 81-88.
- Sterling P, Eyer J (1988) Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology. In: Fisher S, Reason J (Hrsg.): *Handbook of life stress, cognition and health*. New York, Wiley S. 629-649.
- Stevens-Felten SY, Bellinger DL (1997) Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid organs. *Chemical immunology* 69: 99-131.
- Stone AA, Cox DS, Valdimarsdottir H, Jandorf L, Neale JM (1987) Evidence that secretory IgA antibody is associated with daily mood. *Journal of Personality and Social Psychology*. 52(5): 988-993.
- Stone AA, Neale JM, Cox DS, Napoli A, Valdimarsdottir H, Kennedy-Moore E (1994). Daily events are associated with a secretory immune response to an oral antigen in humans. *Health Psychology* 13(5): 440-446.
- Studnitz M, Jensen MB, Pedersen LJ (2007) Why do pigs root and in what will they root? A review on the exploratory behaviour of pigs in relation to environmental enrichment. *Applied Animal Behaviour Science* 107(3-4) 183-197.
- Stull CL, Kachulis CJ, Farley JL, Koenig GJ (1999) The effect of age and teat order on alpha-acid glycoprotein, neutrophil to lymphocyte ratio, cortisol and average daily gain in commercial growing pig. *Journal of Animal Science* 77(1): 70-74.
- Stuss DT, Levine B (2002) Adult clinical neuropsychology: lessons from studies of the frontal lobes. *Annual Review of Psychology* 53: 401-433.
- Suarez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutierrez C (2003) Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. *Transplantation* 75(5): 711-717.
- Sutherland MA, Niekamp SR, Rodriguez-Zas SL, Salak-Johnson JL (2006) Impacts of chronic stress and social status on various physiological and performance measures in pigs of different breeds. *Journal of Animal Science*. 84(3): 588-596.
- Swain SL, Bradley LM, Croft M, Tonkonogy S, Atkins G, Weinberg AD, Duncan DD, Hedrick SM, Dutton RW, Huston G (1991) Helper T-cell subsets: phenotype, function and the role of lymphokines in their development. *Immunological Reviews* 123: 115-144.
- Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW (1983). Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 36(3): 165-186.
- Tian R, Hou G, Li D, Yuan TF (2014) A possible change process of inflammatory cytokines in the prolonged chronic stress and its ultimate implications for health. *Scientific World Journal* Volume 2014, Article ID 780616, 8 Seiten.
- Tomie A, Tirado AD, Yu L, Pohorecky LA (2004) Pavlovian autoshaping procedures increase plasma corticosterone and levels of norepinephrine and serotonin in prefrontal cortex in rats. *Behavioural Brain Research* 153(1): 97-105.
- Toskala E (2014) Immunology. *International Forum of Allergy & Rhinology* 4(S2): S21-S27.
- Trainor BC (2011) Stress responses and the mesolimbic dopamine system: social contexts and sex differences. *Hormones and Behavior* 60(5): 457-469.

- Tuchscherer M, Puppe B, Tuchscherer A, Kanitz E (1998) Effects of Social Status After Mixing on Immune Metabolic and Endocrine Responses in Pig. *Physiology & Behaviour* 64(3): 353-360.
- Tuchscherer M, Kanitz E, Otten W, Tuchscherer A (2002) Effects of prenatal stress on cellular and humoral immune responses in neonatal pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 86(3-4): 195-203.
- Tuckermann JP, Kleiman A, McPherson KG, Reichardt HM (2005) Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 42(1): 71-104.
- Vacca A, Felli MP, Farina AR, Martinotti S, Maroder M, Screpanti I, Meco D, Petrangeli E, Frati L, Gulino A (1992) Glucocorticoid receptor-mediated suppression of the interleukin 2 gene expression through impairment of the cooperativity between nuclear factor of activated T cells and AP-1 enhancer elements. *The Journal of Experimental Medicine* 175(3): 637-646.
- Veissier I, Butterworth A, Bock B, Roe E (2008) European approaches to ensure good animal welfare. *Applied Animal Behaviour Science* 113(4): 279-297.
- Verfaillie T, Cox E, To LT, Vanrompay D, Bouchaut H, Buys N, Goddeeris BM (2001) Comparative analysis of porcine cytokine production by mRNA and protein detection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 81(1-2): 97-112.
- von Andrian UH, Mackay CR (2000) T-cell function and migration—two sides of the same coin. *The New England journal of medicine* 343(14): 1020-1034.
- von Hertzen LC (2002) Maternal stress and T-cell differentiation of the developing immune system: possible implications for the development of asthma and atopy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 109(6): 923-928.
- von Holst D (1998) The concept of stress and its relevance for animal behavior. In: Møller A, Milinski M, Slater P (Hrsg.) *Advances in the Study of Behavior Vol. 27: Stress and Behavior*. Academic Press, San Diego, S. 1-131.
- Watson D, Clark LA (1994) *The PANAS-X: Manual for the positive and negative affect schedule-Expanded Form*. University of Iowa, Iowa City.
- Ward A I, Pietravalle, Cowan, Delahay RJ (2008): Deterrent or dinner bell? Alteration of badger activity and feeding at baited plots using ultrasonic and water jet devices. *Applied Animal Behaviour Science* 115(3-4): 221-232.
- Wehrend A, Tschachtschal J, Bostedt H (2000) Untersuchung zum Verlauf der Plasmaenzymaktivitäten und der Gesamtproteinkonzentration bei Saugferkeln während der ersten drei Lebenswochen. *Tierärztliche Praxis (G)* 28: 33-39.
- Weinberg J, Levine S (1980) Psychobiology of coping in animals: the effects of predictability. In: Levine, S, Ursin H (Hrsg.), *Coping and Health*. Plenum Press, New York, USA, S. 39–59.
- Weiss JM (1971) Effects of coping behavior with and without a feedback signal on stress pathology in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 77(1): 22-30.
- Whitnall M (1993) Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Progress in Neurobiology* 40 (5): 573-629.
- Wiepkema PR, Koolhaas JM (1992) The emotional brain. *Animal Welfare* 1(1): 13-18(6).
- Wu CY, Fargeas C, Nakajima T, Delespesse G (1991) Glucocorticoids suppress the production of interleukin 4 by human lymphocytes. *European Journal of Immunology* 21(10): 2645-2647.

- Wüst S, Federenko IS, van Rossum EF, Koper JW, Hellhammer DH (2005) Habituation of cortisol responses to repeated psychosocial stress-further characterization and impact of genetic factors. *Psychoneuroendocrinology* 30(2): 199-211.
- Xie Z, Miller GM (2009) Trace amine-associated receptor 1 as a monoaminergic modulator in brain. *Biochemical Pharmacology* 78(9): 1095-1104.
- Yeates JW, Main DC (2008) Assessment of positive welfare: a review. *The Veterinary Journal*. 175(3): 293-300.
- Zacharchuk CM, Mercep M, Chakraborti PK, Simons SS Jr, Ashwell JD (1990) Programmed T lymphocyte death. Cell activation- and steroid-induced pathways are mutually antagonistic. *Journal of Immunology* 145(12): 4037-4045.
- Zebunke M, Langbein J, Manteuffel G, Puppe B (2011) Autonomic reactions indicating positive affect during acoustic reward learning in domestic pigs. *Animal Behaviour* 81(2): 481-489.
- Zebunke M, Puppe B, Langbein J (2013) Effects of cognitive enrichment on behavioural and physiological reactions of pigs. *Physiology & Behavior* 118: 70-79.
- Zheng PY, Feng BS, Oluwole C, Struiksma S, Chen X, Li P, Tang SG, Yang PC (2009) Psychological stress induces eosinophils to produce corticotrophin releasing hormone in the intestine. *Gastroenterology* 58(11): 1473-1479.

## Lebenslauf

---

### Persönliche Daten

Name	Jana Brietzke, geb. Wohlgemuth
Geburtsdatum	20. August 1983
Familienstand	verheiratet, 2 Kinder

### Schulische Ausbildung

1994-2003	Erasmus Gymnasium Rostock Abitur
-----------	-------------------------------------

### Universitäre Ausbildung

2003-2009	Universität Rostock Biologiestudium
03/2007-01/2009	Institut für Biomedizinische Technik, Universität Rostock Diplomarbeit "Apoptoseinduktion durch dentale Komposite"
03/2009-04/2012	Universität Rostock Institut für Biomedizinische Technik Etablierung eines <i>in vivo</i> Gewebekulturmodells für porcine Koronarien
04/2012-12-2015	Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) Dummerstorf, Institut für Verhaltensphysiologie-Abteilung Neuroimmunologie Promotion: Neuroendokrine Modulation des Immunsystems durch wiederholte Antizipation beim Hausschwein

## Veröffentlichungen und Vorträge

---

### A) Publikationen in wissenschaftlichen Journalen:

- September 2013      **J Brietzke**, S Jaskulke, P Klöckner, E Kanitz, M Tuchscherer, W Otten, P C Schön, A Tuchscherer, G Manteuffel, U Gimsa (2013)
- “Does repeated anticipation induce neuroendocrine modulation of the immune system in domestic pigs?” (Abstract) *Brain Behavior and Immunity*. 09/2013; 29:S14. DOI: 10.1016/j.bbi.2013.01.042
- Oktober 2014      S Mahnhardt, **J Brietzke**, E Kanitz, P C Schön, A Tuchscherer, U Gimsa, G Manteuffel (2014)
- “Anticipation and frequency of feeding affect heart reactions in domestic pigs” *Journal of Animal Science*. 11/2014; 92(11):4878-87. DOI: 10.2527/jas.2014-7752

### B) Konferenzen & Workshops

- September 2011      45. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik (DGBMT)
- Tagungsband und Vortrag: „Development of a tissue culture model for investigating drug absorption and distribution within the blood vessel wall after drug-eluting stent implantation
- September 2012      4<sup>th</sup> European Veterinary Immunology Workshop Edinburgh
- September 2012      European Congress of Immunology Glasgow
- Oktober 2012      Autumn School Bad Schandau
- Current Concepts in Immunology
- Tagungsband und Vortrag: „Neuroendocrine modulation of the immune system by repeated anticipation in domestic pigs”

- März 2013                    10th Congress of the German-Endocrine-Brain-Immune-Network  
(GEBIN) Regensburg
- Educational Short Courses
- Tagungsband und Vortrag: „Does repeated anticipation induce  
neuroendocrine modulation of the immune system in domestic pigs?“
- 
- Mai 2013                    Tag des Doktoranden FBN Dummerstorf
- Vortrag: „Neuroendokrine Modulation des Immunsystems durch  
wiederholte Antizipation beim Hausschwein“
- 
- Juni 2013                    20<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Psycho Neuro Immunology  
Research Society's (PNIRS) Stockholm
- Tagungsband und Posterpräsentation: „Neuroendocrine modulation of  
the immune system by repeated anticipation in domestic pigs“
- 
- April 2015                    Innovationsforum Tierwohl Dummerstorf, Innovationskongress

## Danksagung

---

Die Durchführung und Fertigstellung dieser Dissertation wäre ohne die zahlreiche Unterstützung verschiedenster Menschen nie möglich gewesen. Ihnen gilt mein ganzer Dank!

Zu allererst möchte ich Frau Prof. Dr. Ulrike Gimsa danken, die mir nicht nur die Möglichkeit gab, an diesem interessantem Projekt mitzuwirken, sondern mir auch stets zur Seite stand.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Manteuffel für die Vergabe dieser Promotionsstelle und die anregenden Diskussionen danken.

Ich danke allen Mitarbeitern des Institutes für Verhaltensphysiologie des FBNs für die herzliche Aufnahme am Institut und das angenehme Arbeitsklima.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Dr. Steffi Mahnhardt für Ihre Mit- und Vorarbeit bedanken.

Ich möchte mich auch ganz besonders Martina Pohlmann und Birgit Sobczak danken, die mich sehr herzlich aufgenommen haben. Ohne Ihre Unterstützung wäre der Ablauf des Versuchs so kaum möglich gewesen. Außerdem wurde ich tatkräftig bei den analytischen Untersuchungen durch Petra Müntzel, Regina Wal, Dagmar Müntzel und Sylvia Langhoff unterstützt. Ein großes Dankeschön dafür!

Frau Margret Tuchscherer, Frau Ellen Kanitz und Herrn Winfried Otten möchte ich für die fachliche Unterstützung danken.

Vielen Dank auch für die sehr gute fachliche Betreuung zur statistischen Auswertung durch Herrn Dr. Armin Tuchscherer.

Ich danke Dr. Sandra Döpjan sehr für ihre Hilfe bei verhaltensrelevanten Fragestellungen sowie bei der statistischen Auswertung.

Für die Unterstützung bei allen computertechnischen Problemen möchte ich mich bei Dr. Christian Manteuffel bedanken.

Ich danke weiterhin Jutta Hoffmann für ihre Hilfe bei allen bürokratischen Angelegenheiten.

Meinen Freunden und Kollegen Annika Krause, Steffi Mahnhardt und Jenny Stracke möchte ich für die seelische und fachliche Unterstützung danken.

Der größte Dank geht an meine *kleine* und an meine *große* Familie, die mir stets mit viel Liebe und Geduld den Rücken gestärkt haben.

Für die Finanzierung meiner Promotion danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem FBN Dummerstorf.

## **Selbständigkeitserklärung**

---

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Neuroendokrine Modulation des Immunsystems durch wiederholte Antizipation beim Hausschwein (*Sus scrofa domestica*)“ selbständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, 22.03.2016