

Evaluierung von Alpha-Amylase und Substanz P als neue
Stressparameter bei gerittenen Pferden mit eng verschnallten
Nasenriemen in einem vierstufigen Stressmodell

Von Dominik Tobias Scholler

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Evaluierung von Alpha-Amylase und Substanz P als neue
Stressparameter bei gerittenen Pferden mit eng verschnallten
Nasenriemen in einem vierstufigen Stressmodell

von Dominik Tobias Scholler

aus Regensburg

München 2023

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Pferdemedizin

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ-Prof. Dr. Anna May

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Anna May

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Ralph S. Müller

Tag der Promotion: 22. Juli 2023

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG.....	1
II. LITERATURÜBERSICHT	3
1. Stress.....	3
1.1. Definition Stress.....	3
1.2. Stress bei Pferden.....	4
1.3. Biochemische Stressparameter.....	5
1.3.1. Cortisol.....	5
1.3.2. Substanz P	6
1.3.3. Alpha-Amylase.....	9
1.4. Heart Rate Variability (HRV)	11
1.5. Ridden Horse Ethogram (RHE)	12
2. Nasenriemen	14
2.1. Definition Nasenriemen	14
2.2. Regelung im Reitsport.....	14
2.3. Nasenriemen als Stressor	15
3. Overground-Endoskopie	16
3.1. Overground-Endoskop als Stressor.....	16
III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	18
1. Zielsetzung	18
2. Stressparameter.....	18
2.1. Alpha-Amylase.....	18
2.2. Substanz P	21
2.3. Cortisol.....	22
2.4. Heart Rate Variability (HRV)	25
2.5. Ridden Horse Ethogram (RHE)	26
3. Publikation.....	26
IV. ERWEITERTE DISKUSSION	42
V. ZUSAMMENFASSUNG	50
VI. SUMMARY	51

VII. LITERATURVERZEICHNIS	52
VIII. DANKSAGUNG	69

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ANS	Autonomes Nervensystem
bzw.	Beziehungsweise
CRH	Corticotropes Releasinghormon; Corticoliberin
EKG	Elektrokardiogramm
etc.	Et cetera
FEI	Fédération Equestre Internationale
ggr.	Geringgradig
GNRH	Gonadotropes Releasinghormon
HF	High frequency
hgr.	Hochgradig
HGS	Horse Grimace Scale
HHN	Hypothalamus-Hypophysen- Nebennierenrinden-Achse
HR	Herzfrequenz
HRV	Herzfrequenzvariabilität
HVL	Hypophysenvorderlappen
IBI	Inter-Beat-Intervall
ISES	International Society for Equitation Science
KNHS	Königlicher Pferdesportverband der Niederlande
LF	Low frequency
LPO	Leistungsprüfungsordnung
mgr.	Mittelgradig
n	Anzahl
n.m.	Nicht messbar
ng	Nanogramm
nmol	Nanomol
NK-1-Rezeptor	Neurokinin-1-Rezeptor
pg	Picogramm
RHE	Ridden-Horse-Ethogram
RMSSD	Root mean square of successive differences
sAA	Speichel-Alpha-Amylase
SDNN	Standard deviation normal-normal
SP	Substanz P

SVPS	Schweizerischer Verband für Pferdesport
U	Unit
ZNS	Zentrales Nervensystem

I. EINLEITUNG

Der Pferdesport sieht sich in den vergangenen Jahren immer öfter im Fokus öffentlicher Kritik, vor allem hinsichtlich des Tierwohls bei Pferdesportveranstaltungen oder beim Training und der Ausbildung von Pferden. Ein zentraler Kritikpunkt ist dabei immer wieder die korrekte Verschnallung von Nasenriemen, da diese, wenn sie zu eng sind, bei Pferden nachgewiesenermaßen Stress und Unwohlsein hervorrufen, was sich in unterschiedlichen physiologischen Reaktionen äußern kann. Neben lokalen physischen Auswirkungen sind vor allem Anstiege bei unterschiedlichen Stressparametern nachgewiesen, so beispielsweise neben Veränderungen von Herzfrequenz und Herzfrequenzvariabilität, sowie Änderungen der Augentemperatur und Verhaltensveränderungen vor allem ein Anstieg von biochemischen Stressparametern (McGreevy, Warren-Smith et al. 2012, Fenner, Yoon et al. 2016, Doherty, Casey et al. 2017, Duke 2017, Uldahl und Clayton 2019). Der wohl am weitesten verbreitete Stressparameter in der Pferdemedizin ist dabei sicherlich Cortisol (Hellhammer, Wüst et al. 2009), welches sich sowohl aus dem Serum, als auch aus Speichelproben bestimmen lässt. Über dessen Zusammenhang mit psychischem und emotionalem Stress ist jedoch bislang noch wenig bekannt (Campbell und Ehlert 2012). Diese Komponenten spielen allerdings gerade in Verbindung mit der stark einschränkenden Natur von zu eng verschnallten Nasenriemen mutmaßlich eine bedeutende Rolle, vor allem wenn Pferden durch diese Art der Verschnallung die Möglichkeit genommen wird, auf die Einwirkung einer harten Hand des Reiters zu reagieren. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere, biochemische Stressparameter untersucht, welche beim Pferd noch nicht etabliert sind. In der Humanmedizin steht dabei Substanz P im Zentrum vieler Forschungen, welche zum Teil einen engen Zusammenhang zwischen emotionalem Stress, sowie angstassoziiertem Verhalten und erhöhten Substanz P-Werten zeigen konnten (Schedlowski, Fluge et al. 1995, Ebner, Rupniak et al. 2004, Ebner und Singewald 2006). Beim Rind wurden erhöhte Substanz P-Werte hingegen vor allem mit schmerzassoziierten Stressoren in Verbindung gebracht (Coetzee, Lubbers et al. 2008, Whitlock, Coffman et al. 2012, Bustamante, Rodriguez et al. 2015, Barragan, Pineiro et al. 2018, Tschoner und Feist 2022), während bei Pferden Substanz P, vor allem als Stressmarker, bislang kaum untersucht ist. Neben Substanz P wurde zudem Alpha-Amylase im Serum

untersucht. Ziel der Studie war es, die Eignung von Substanz P und Alpha-Amylase als neue Stressparameter beim Pferd herauszuarbeiten, vor allem im Zusammenhang mit vorwiegend psychischem Stress. Hierfür wurde ein vierstufiges Stressmodell verwendet, bei dem Nasenriemen und Overground-Endoskop als Stressoren wirkten. Dabei wurden die Konzentration von Substanz P und die Alpha-Amylase Aktivität im Blut bestimmt und mit den etablierten Stressparametern Cortisol und Herzfrequenzvariabilität, sowie einer Analyse des Verhaltens mittels Ridden Horse Ethogram verglichen. Darüber hinaus sollten Referenzwerte für Substanz P und Serum-Alpha-Amylase beim Pferd herausgearbeitet werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Stress

1.1. Definition Stress

Stress ist ein nur schwer objektivierbarer Parameter in der Human- sowie vor allem der Veterinärmedizin, da immer auch subjektive Empfindung und individuelle Unterschiede Einfluss auf die Wahrnehmung von Stress als solchen nehmen (Dyson, Berger et al. 2018). Im Allgemeinen umfasst der Begriff Stress alle Faktoren, welche das Stoffwechselgleichgewicht gefährden können (Smith und Vale 2006) und beinhaltet sowohl systemischen, als auch lokalen Stress (Lu, Wei et al. 2021). Dies schließt sowohl äußere als auch alle inneren Einflüsse, welche eine unspezifische Reaktion des Körpers erfordern, ein (Koolhaas, Bartolomucci et al. 2011, Lopresti 2020). Hierzu zählen physikalische Faktoren wie Umwelteinflüsse, biologische Faktoren wie Erkrankungen und Infektionen oder soziale Faktoren wie jegliche Form interindividueller Auseinandersetzungen, Isolation, Crowding, Prädation, etc. Der Körper reagiert auf diese Stressoren mit Anpassungsmechanismen, welche auf ein Ausgleichen oder Vermeiden dieser Faktoren abzielen. Es kommt zu einer Erhöhung der Alarm- und Fluchtbereitschaft, einer vermehrten Energiebereitstellung in relevanten Geweben, einer Unterdrückung anderer, nicht akut überlebensnotwendiger Systeme, wie Reproduktion und Wachstum, einer Hemmung von Nahrungsaufnahme und Verdauung, sowie einer Erhöhung der Schmerzschwelle (Joseph und Whirledge 2017). Um das Stoffwechselgleichgewicht wiederherzustellen aktiviert der Organismus eine umfangreiche Antwort, welche hormonelle, neurologische und immunologische Systeme umfasst, die sogenannte Stressantwort (Carrasco und Van de Kar 2003). Diese soll in den folgenden Abschnitten näher charakterisiert werden.

Besonders in der Tiermedizin ist daher ein Kollektiv an verschiedenen Parametern erstrebenswert, um ein möglichst genaues und objektives Bild der Stressbelastung für das einzelne Individuum zu erhalten.

1.2. Stress bei Pferden

Pferde sind als Fluchttiere besonders anfällig für vielfältige Arten von Stress (Carroll, Sykes et al. 2022). Sie reagieren instinktiv mit Meidungsverhalten auf potenzielle Gefahren und auf Umstände, die damit assoziiert sind. Schnelle Bewegungen, laute Geräusche, unbekannte Strukturen und vieles mehr können ein akutes Stressereignis darstellen, auf welches Pferde in der Regel mit Flucht reagieren wollen (Lee, Kim et al. 2021, Carroll, Sykes et al. 2022). Ist dies nicht möglich, beispielsweise aufgrund der Haltungsbedingungen oder weil gerade reiterlich genutzt, kann dies zu einer nicht unerheblichen Zunahme des Stresslevels führen, einhergehend mit einer gesteigerten Ausschüttung von Stresshormonen und körperlichen Anzeichen des Unwohlseins. So kam eine Studie über den Einfluss verschiedener Haltungsbedingungen zu dem Ergebnis, dass Pferde in traditioneller Stallhaltung höhere Stresslevel und Anzeichen chronischen Stresses aufwiesen, als Pferde, die unter natürlicheren Bedingungen mit freier Bewegung, sozialen Interaktionen und unbegrenzter Futteraufnahme gehalten wurden (Placci, Marliani et al. 2020). Ebenso können verschiedene Trainingsmethoden bei Reitpferden, wie zum Beispiel die Hyperflexion von Kopf und Hals (Rollkur) bei Dressurpferden, nachweislich akuten Stress auslösen (Christensen, Beekmans et al. 2014, Zebisch, May et al. 2014), wobei dies mitunter kontrovers diskutiert wird und auch vom Erfahrungslevel der Pferde beeinflusst werden könnte, wonach erfahrene Elite-Dressurpferde weniger akute Stressreaktionen zeigen (van Breda 2006). Andere Studien konnten dagegen keinen Zusammenhang zwischen Stresslevel und der Erfahrung von Pferden herstellen (Ille, Von Lewinski et al. 2013, Topczewska, Krupa et al. 2021).

Pferde haben von Natur aus nur eine begrenzte Möglichkeit Unwohlsein, Stress oder Schmerzen auszudrücken. Dies geschieht vor allem mit Hilfe verschiedener körpersprachlicher Signale, von denen die meisten mehr oder weniger okkult und nur bei genauerem Betrachten deutlich erkennbar sind (Fureix, Bourjade et al. 2012, Fureix, Jego et al. 2012). Diese Form des Ausdrucks von Stress kann Teil einer Bewältigungsstrategie sein, mit der das Pferd versucht, auf den Stressor zu reagieren (Fureix, Bourjade et al. 2012, Fureix, Jego et al. 2012, Krueger, Esch et al. 2021). Verschiedene Ansätze haben bislang versucht, Verhalten und Körpersprache von Pferden hinsichtlich Anzeichen von Stress, Unwohlsein und Schmerzen zu objektivieren, so beispielsweise der Horse Grimace Scale (HGS),

welcher auf Basis des Gesichtsausdrucks von Pferden eine standardisierte Schmerzskala beinhaltet (Dalla Costa, Minero et al. 2014). Daneben wurde das Equine Discomfort Ethogram entwickelt, welches 64 unterschiedliche spezifische Verhaltensweisen, die bei Pferden auf Unwohlsein hindeuten, charakterisiert und diese nochmals in acht Gruppen unterteilt (Torcivia und McDonnell 2021). Bei gerittenen Pferden wurde zudem das Ridden Horse Ethogram (RHE) entwickelt, das anhand von 24 Parametern ein Erkennen von Schmerzen und Stress unter dem Sattel ermöglichen soll (Dyson, Berger et al. 2018). Darüber hinaus sind beim Pferd auch biochemische Stressparameter in Blut und Speichel beschrieben, auf welche im Folgenden näher eingegangen wird.

1.3. Biochemische Stressparameter

1.3.1. Cortisol

Auf physiologischer Ebene laufen im Körper eine Vielzahl von Mechanismen entlang der sogenannten "Stressachse" ab. Dies ist ein komplexes Gefüge aus mehreren übereinander geschalteten Zentren, welche eine Reihe physiologischer Adaptationen bewirken (Carrasco und Van de Kar 2003). Diese Achse wird als Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN) bezeichnet (Smith und Vale 2006). Im Hypothalamus wird dabei das Hormon Corticoliberin (Corticotropin Releasing Hormone, CRH) gebildet, welches zu einer Ausschüttung von adrenocorticotropem Hormon (ACTH) im Hypophysenvorderlappen (HVL) und zum Teil auch der Pars intermedia der Hypophyse führt (Stephens und Wand 2012). Das ACTH wiederum bewirkt an seinem Zielorgan, der Nebennierenrinde, eine vermehrte Cortikosteroidsynthese, und somit vor allem eine vermehrte Ausschüttung von Glukokortikoiden in das periphere Blut (Stephens und Wand 2012, Rhodes 2016).

Cortisol wirkt über Steroidhormonrezeptoren an allen Zellen des Organismus (Joseph und Whirledge 2017) und führt hierbei zu einer Erhöhung des Blutglukose-Spiegels, es hemmt die Reproduktionsachse über eine negative Rückkopplung auf die hypothalamische GnRH-Sekretion (gonadotropes Releasinghormon) und wirkt über eine Hemmung des Immunsystems antiinflammatorisch und antiproliferativ (Oakley und Cidlowski 2011). Insgesamt wird Cortisol dabei beim Menschen als einer der wichtigsten Parameter im Rahmen einer Reaktion auf stressbedingte

Ereignisse angesehen (Hellhammer, Wüst et al. 2009), wobei bislang über den genauen Zusammenhang mit emotionalem Stress wenig bekannt ist (Campbell und Ehlert 2012).

Bei Pferden werden erhöhte Cortisol-Konzentrationen im Serum generell als validierter Stressparameter angesehen (Peeters, Sulon et al. 2011, Sauer, Hermann et al. 2019, Potier und Louzier 2023). Ein Anstieg des Serum-Cortisols wurde unter verschiedensten stressassoziierten Bedingungen nachgewiesen, unter anderem im Zusammenhang mit körperlicher Anstrengung (Snow und Rose 1981), Transport (Baucus, Squires et al. 1990), sexueller Erregung (Colborn, Thompson et al. 1991) oder verschiedenen Erkrankungen (Ayala, Martos et al. 2012) und Operationen (James, Horner et al. 1970). Die Angaben zu physiologischen Cortisolwerten im Serum bei gesunden Kontrollgruppen variieren zum Teil stark und reichen von Konzentrationen von 30-40 nmol/l (Ayala, Martos et al. 2012) über 50-190 nmol/l (Döcke 1994) bis hin zu 193 nmol/l (James, Horner et al. 1970). Darüber hinaus wurden in verschiedenen Studien Cortisol-Konzentrationen zur Evaluation von Stress auch im Speichel bestimmt, vor allem im Zusammenhang mit reiterlicher Nutzung (Becker-Birck, Schmidt et al. 2013) und Wettkämpfen auf Turnieren (Becker-Birck, Schmidt et al. 2013, Peeters, Closson et al. 2013), sowie beim Transport (Schmidt, Mostl et al. 2010). Hierbei lagen die Cortisol-Konzentrationen im Speichel in Ruhe zwischen 1 nmol/l (Peeters, Closson et al. 2013) und 4 nmol/l (Becker-Birck, Schmidt et al. 2013) und somit deutlich niedriger im Vergleich zu den Konzentrationen im Serum.

1.3.2. Substanz P

Substanz P (SP) ist ein Neuropeptid, welches sich aus elf Aminosäuren zusammensetzt. Es ist sowohl innerhalb, als auch außerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) lokalisiert (Nieber und Oehme 1982) und spielt eine wichtige Rolle bei der Steuerung neuronaler Aktivität, sekretorischer Vorgänge, der Aktivität der glatten Muskulatur und der Regulation des Blutdrucks (Nieber und Oehme 1982). Im zentralen Nervensystem werden SP und dessen spezifische Neurokinin-1-Rezeptoren (NK-1-Rezeptoren) in hohen Konzentrationen vor allem im Endhirn im Bereich des limbischen Systems und der Amygdala nachgewiesen (McLean, Ganong et al. 1991). In enger Verbindung dazu steht eine Rolle in der Wahrnehmung und Verarbeitung von emotionalem Stress und Angstzuständen (Ebner, Rupniak et al. 2004, Ebner und Singewald 2006). Die Amygdala gilt hierbei

als Schlüsselregion des Gehirns zur Steuerung und Verarbeitung von emotionalem Stress und Angst (Sosulina, Strippel et al. 2015). Substanz P kommt zudem hauptsächlich in primär afferenten Neuronen vor und wird vor allem von sensiblen Neuronen mit unmyelinisierten Fasern gebildet (Herbert und Holzer 2002), weshalb ihm ebenso eine Rolle in der Schmerzwahrnehmung zugesprochen wird. Weiterhin wird SP auch von Immunzellen gebildet und nimmt dabei eine proinflammatorische Rolle ein (Suvas 2017).

In all seinen Funktionen hat Substanz P sowohl eine regulierende, als auch eine modulierende Funktion (Nieber und Oehme 1982). Die regulierende Funktion scheint dabei eng mit endogenen Opioiden und Katecholaminen verknüpft zu sein (Nieber und Oehme 1982) und somit in enger Relation zu schmerz- und stressassoziierten Parametern zu stehen.

In der Humanmedizin wird die Rolle von SP in verschiedensten physiologischen Zusammenhängen bereits seit vielen Jahren untersucht, so beispielsweise dessen Rolle bei der Immunantwort (Mashaghi, Marmalidou et al. 2016), Wundheilung (Suvas 2017), oder im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen (Feickert und Burckhardt 2019). Darüber hinaus haben zahlreiche Studien die Beteiligung von SP und seinem spezifischen Neurokinin-1-Rezeptor (NK-1-Rezeptor) an der Wahrnehmung und Verarbeitung von emotionalem Stress untersucht. Eine Blockade von Neurokinin-1-Rezeptoren und somit der Wirkung von SP im Gehirn führte dabei zu einem angstlösenden Effekt (Ebner, Muigg et al. 2008). Die Beteiligung von SP an der Pathophysiologie von Angststörungen haben Iftikhar et al. (2020) untersucht und dabei gezeigt, dass SP als Stressantwort auf einen emotionalen Stressor ausgeschüttet wird, welcher Angstzustände auslöst und über eine Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden Achse (HHN) zudem einen Anstieg von Cortisol bewirkt (Iftikhar, Siddiq et al. 2020). Andere Studien kommen in diesem Zusammenhang jedoch zu dem Ergebnis, dass SP stress-induzierte Störungen normalisieren kann, indem es in das Stoffwechselgleichgewicht des Katecholaminsystems der HHN eingreift (Oehme, Hecht et al. 1987). Eine Untersuchung von der SP-Konzentration hinsichtlich akuter und chronischer Stressoren zeigte, dass sich SP beim Menschen durch einen akuten, starken Stressor nicht beeinflussen ließ (Schedlowski, Fluge et al. 1995), wobei ängstlichere Probanden im Schnitt höhere SP-Plasma-Konzentrationen aufwiesen als weniger ängstliche (Schedlowski, Fluge et al. 1995). Untersuchungen

zu chronischem Stress im Rahmen von Hauterkrankungen ergaben, dass affektierte Personen in Hautzellen von Hautarealen, welche nicht von einer Erkrankung betroffenen waren, höhere SP-Konzentrationen, sowie eine erhöhte Anzahl an NK-1-Rezeptoren aufwiesen (Remrod, Lonne-Rahm et al. 2007). Jessop et al. (2000) hingegen schrieben SP eine möglicherweise wichtige zentrale Funktion im Rahmen der Steuerung des Übergangs von akutem zu chronischem Stress zu, indem SP nicht die initiale Stressantwort der HHN hemmt, jedoch auf zentraler Ebene über NK-1-Rezeptoren die Dauer der Stressantwort reduzieren kann (Jessop, Renshaw et al. 2000).

In der Tiermedizin gibt es ebenso unterschiedliche Untersuchungen über die Bedeutung von SP bei verschiedenen Spezies. So wurde bei Katzen beispielsweise der Zusammenhang von SP mit Aggression und Abwehrverhalten untersucht (Gregg und Siegel 2001), wobei sich zeigte, dass, neben anderen Neurotransmittern, vor allem erhöhte SP-Konzentrationen in bestimmten Gehirnarealen (vorwiegend zentrales Höhlengrau und Hypothalamus) ein aggressives Abwehrverhalten fördern können und SP hierbei eine Schlüsselrolle einzunehmen scheint (Gregg und Siegel 2001). Bei Ratten wurde der Einfluss von Stress durch kurzzeitige Fixation auf Änderungen des SP-Gehalts neuronalen Gewebes im ZNS untersucht, wobei sich signifikante Anstiege der SP-Level nachweisen ließen (Rosen, Brodin et al. 1992). SP als Biomarker zur Objektivierung von Schmerz als Stressor wurde bislang vor allem beim Rind untersucht und dabei als geeigneter Parameter herausgearbeitet (Coetzee, Lubbers et al. 2008, Bustamante, Rodriguez et al. 2015, Barragan, Pineiro et al. 2018, Tschoner und Feist 2022). In einer Studie mit Kälbern, die nach Kastration einen deutlichen Anstieg der Plasmakonzentration von SP auf durchschnittlich $506,43 \pm 38,11$ pg/ml (Coetzee, Lubbers et al. 2008) zeigten, wurde dabei SP als einer der spezifischsten Biomarker für Schmerz beim Rind herausgearbeitet (Bustamante, Rodriguez et al. 2015). So wurde das Ausbleiben eines Anstiegs der Plasmakonzentration von SP nach Elektroejakulation bei Bullen als fehlende Schmerzwahrnehmung interpretiert (Whitlock, Coffman et al. 2012). Auch Untersuchungen zur Stress- und Schmerzantwort bei Milchkühen mit Lahmheiten (Bustamante, Rodriguez et al. 2015) oder klinischen Metritiden (Barragan, Pineiro et al. 2018) zeigten einen deutlichen Anstieg von Substanz P bei betroffenen Tieren. Die SP-Plasmakonzentrationen lagen hierbei bei maximal $2,20 \pm 0,47$ ng/ml

(Bustamante, Rodriguez et al. 2015) und $47,15 \pm 5,38$ ng/ml (Barragan, Pineiro et al. 2018). Auf die deutlich heterogenen und unterschiedlichen Werte der Konzentrationen in verschiedenen Studien wurde dabei bereits hingewiesen (Tschoner und Feist 2022). Demnach lagen die derart heterogenen Ergebnisse hauptsächlich in zu uneinheitlichen Studiendesigns, Tiergruppen oder durchgeführten Untersuchungen begründet (Tschoner und Feist 2022). Viele Studien hatten keine Kontrollgruppen und es fehlen Studien zur Etablierung von Referenzwerten bei gesunden, adulten Rindern und Kälbern (Tschoner und Feist 2022).

Bei Pferden gibt es unterschiedliche Studien, welche sich mit Substanz P beschäftigt haben, unter anderem als Neurotransmitter im Darm (Malone, Kannan et al. 2000) oder als beteiligtes Agens in der Synovia bei Gelenkerkrankungen (Caron, Bowker et al. 1992, Kirker-Head, Chandna et al. 2000). Zu Substanz P als Marker im Zusammenhang mit Schmerz oder Stress gibt es bei Pferden eine Untersuchung zur Auswirkung von stressassoziierten Trainingsmethoden bei Tennessee Walking Horses (Everett, Schumacher et al. 2018). Im Rahmen dieser Studie wurden Pferde mit Ketten und keilförmigen Platten an den Vorderbeinen als Trainingsmethode für den rassetypischen Gang versehen und der Zusammenhang mit Stress und Schmerz untersucht (Everett, Schumacher et al. 2018). Demnach konnten keine signifikanten Änderungen von SP oder Cortisol-Konzentrationen und somit kein messbarer akuter oder subakuter Stress im Zusammenhang mit den untersuchten Trainingsmethoden nachgewiesen werden (Everett, Schumacher et al. 2018). Die SP-Konzentrationen der untersuchten Pferde lagen dabei bei $74,4 \pm 6,9$ pg/ml bzw. $91,8 \pm 6,9$ pg/ml in der Kontrollgruppe (Everett, Schumacher et al. 2018).

1.3.3. Alpha-Amylase

Alpha-Amylase ist vorrangig ein Verdauungsenzym, welches durch hydrolytische Spaltung von alpha-1,4-glykosidischen Bindungen an der Aufspaltung von Amylase und somit der Stärkeverdauung beteiligt ist. Alpha-Amylase wird zum einen, vor allem bei Monogastriern, zu einem nicht unerheblichen Anteil in den Speicheldrüsen gebildet und mit dem Speichel sezerniert, zum anderen aber auch im Pankreas für die intestinale Stärkeverdauung, sowie darüber hinaus in der Leber synthetisiert (Janowitz und Dreiling 1959). Neben ihrer verdauungsphysiologischen Funktion wird vor allem der Speichel-Alpha-Amylase

(sAA) eine Bedeutung als Biomarker für Stress zugeschrieben, da eine Stimulation durch Stress die Sekretion in den Azinuszellen der Speicheldrüsen fördert (Baum 1993, Rohleder und Nater 2009). So wurde sAA beispielsweise bereits als geeigneter Stressmarker bei vielen Spezies beschrieben, unter anderem bei erkrankten Hunden (Hong, Oh et al. 2019), bei Schweinen (Fuentes, Tecles et al. 2011), Schafen (Fuentes-Rubio, Fuentes et al. 2016) oder Primaten (Broche, Takeshita et al. 2019). Ein Anstieg von Alpha-Amylase im Serum ist in aller Regel auf eine Erhöhung der Pankreas-Alpha-Amylase zurückzuführen, beispielsweise im Rahmen einer Pankreatitis (Janowitz und Dreiling 1959). Hierbei kann die im Pankreas gebildete Alpha-Amylase zum einen direkt über beschädigtes Gewebe und im Rahmen der lokalen Entzündungsreaktion und zum anderen über lymphatische Resorption aus der Bauchhöhle ins Blut gelangen und dort zu einem deutlichen Anstieg der Enzymaktivität und -konzentration im Serum führen (Janowitz und Dreiling 1959). Beim Menschen wurden darüber hinaus auch Anstiege der Serum Alpha-Amylase im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen wie Mumps oder Tumorerkrankungen, sowie bei Stress oder Depression postuliert (Mandal, Bhattacharjee et al. 2019).

Bei Pferden sind, aufgrund der in der Regel stärkearmen Nahrung, im Vergleich zu anderen Monogastriern wie Schweinen, Hunden oder Menschen, die Konzentrationen von Alpha-Amylase in aller Regel naturgemäß relativ niedrig. Hingegen gibt es zahlreiche Veröffentlichungen, welche Alpha-Amylase im Speichel bei Pferden in verschiedenen Pilotstudien als geeigneten Stressparameter postulieren (Contreras-Aguilar, Escribano et al. 2018, Contreras-Aguilar, Henry et al. 2019, Contreras-Aguilar, Martinez-Subiela et al. 2019, Contreras-Aguilar, Ceron et al. 2021) und dabei sowohl eine Messung der sAA-Aktivität, als auch der Konzentration als geeigneten Biomarker herausarbeiten (Fuentes-Rubio, Fuentes et al. 2015). Auch der Einfluss des zirkadianen Rhythmus wurde dabei bereits untersucht (Contreras-Aguilar, Lamy et al. 2020), sowie der Einfluss von Kontamination der Speichelproben mit Futterpartikeln (Contreras-Aguilar, Hevia et al. 2020). Hier zeigte sich, dass vor allem eine Kontamination mit Heu und Gras die Konzentration von sAA in den Proben erhöhen kann (Contreras-Aguilar, Hevia et al. 2020). Eigene Untersuchungen haben darüber hinaus ergeben, dass eine starke Kontamination der Speichelproben mit Futterpartikeln zu Interferenzen mit der photometrischen Bestimmung der sAA-Konzentration führt und in extremen Fällen

eine aussagekräftige Messung unmöglich machen kann.

Im Serum kann eine Erhöhung auch beim Pferd auf eine Pankreatitis hinweisen, die jedoch bei dieser Spezies äußerst selten vorkommt (Yamout, Nieto et al. 2012, Newman 2015). Alpha-Amylase wird außerdem bei Schädigung der Darmschleimhaut oder der Nierentubuli ausgeschüttet (McClure 1987, Dacre, Pirie et al. 2003). Manche Pferde haben jedoch in seltenen Fällen trotz Pankreatitis niedrige Alpha-Amylase-Werte, insbesondere bei vorliegender Hyperlipämie (Taintor, Sartin et al. 2006, Newman 2015). Einige Autoren bezweifeln jedoch grundsätzlich eine Anwesenheit von Alpha-Amylase im Serum bei Pferden (Franzini und Bonini 1969). Allerdings scheint es hierbei auch rassebedingte Unterschiede auf genetischer Ebene im Hinblick auf Speichel- und pankreatische Alpha-Amylase zu geben (Coizet, Nicoloso et al. 2014).

1.4. Heart Rate Variability (HRV)

Die Herzfrequenzvariabilität (HRV) kann ein weiterer Indikator für Stress sein (Mohr, Witte et al. 2000). Dem Kreislauf fällt in Belastungssituationen die wichtige Aufgabe zu, dem Organismus für die „Fight or Flight“-Reaktion schnell Sauerstoff und Substrate des Energiestoffwechsels bereitzustellen. Eine zentrale Stellung nimmt dabei die Herzleistung ein, die in Stresssituationen, beeinflusst durch das autonome Nervensystem, mit Veränderungen der Herzfrequenz reagiert (Moberg 2000). Nicht nur auf humoralem Wege wird Einfluss auf die Herzfrequenz genommen. Die übergeordnete Regulation erfolgt beispielsweise in emotionalen Belastungssituationen in neokortikalen Strukturen des Gehirns, wobei aufgrund einer Zunahme der sympathischen und einer Abnahme der parasympathischen Aktivität eine Erhöhung der Herzfrequenz zu beobachten ist (Shapiro, Sloan et al. 1993). Die HRV ist vor allem durch spezifische Fluktuationen des zeitlichen Abstands zweier aufeinanderfolgender Herzschläge, sogenannter Inter-beat-Intervalle (IBI), charakterisiert (Stucke, Große Ruse et al. 2015). Speziesübergreifend ist die Exposition mit einem akuten oder chronischen Stressor mit einer Reduktion der HRV assoziiert (Gaidica und Dantzer 2020). Eine Reduktion der HRV ist dabei das Ergebnis einer Aktivierung der sympathischen und Unterdrückung der parasympathischen übergeordneten Zentren des autonomen Nervensystems (ANS) (Schiweck, Piette et al. 2019). Diese sympathisch-parasympathische Interaktion lässt sich mit Hilfe der HRV nicht-invasiv objektivieren (Sammito und Bockelmann 2015). Ereignisse, welche der

Organismus als Stress wahrnimmt, führen über eine Aktivierung des sympathischen Anteils des ANS unter anderem zu einer Erhöhung der Herzfrequenz (HR) und einer Reduktion der HRV. Dies wird als Strategie des Körpers angesehen, einen möglichst konstanten Blutfluss und somit eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff aufrecht zu erhalten (Gaidica und Dantzer 2020).

Bei Pferden wird die HRV neben der Untersuchung der ANS-Aktivität (Kuwahara, Hashimoto et al. 1996, Stucke, Große Ruse et al. 2015) und der Ermittlung der Stressantwort (Visser, van Reenen et al. 2002) auch im Zusammenhang mit der Diagnostik von Arrhythmien (Mitchell und Schwarzwald 2021) und der Bewertung von Fitness und Trainingszustand bei Sportpferden (Kinnunen, Laukkanen et al. 2006, Szabó, Vizesi et al. 2021) angewandt.

Die HRV kann dabei mit Hilfe verschiedener Methoden bestimmt werden. Die beiden am weitesten verbreiteten sind die sogenannten Time-domain und Frequency-domain Analysen (McConachie, Giguere et al. 2016). Die Time-domain Analyse der HRV umfasst dabei die Standardabweichung der Länge aller normalen Sinus-RR-Intervalle in Millisekunden (standard deviation normal-normal; SDNN), sowie das quadratische Mittel aller normalen Sinus-RR-Intervall-Unterschiede in Millisekunden (root mean square of successive differences: RMSSD) (McConachie, Giguere et al. 2016). Bei der Frequency-domain Analyse erfolgt die Ermittlung der HRV mittels einer Spektralanalyse der Herzfrequenz. Diese resultiert in einer Aufteilung der Herzfrequenz in verschiedene Frequenzbereiche, solche mit niedriger Frequenz (Low frequency; LF) und solche mit höherer Frequenz (High frequency; HF) (McConachie, Giguere et al. 2016).

1.5. Ridden Horse Ethogram (RHE)

Schmerz und Stress gelten, wie eingangs erwähnt, vor allem in der Tiermedizin als nur schwer objektivierbar (Dyson, Berger et al. 2018). Auch die emotionale Komponente von Stress und Schmerz lässt sich dabei bis dato nicht mit objektiven Messmethoden bestimmen (Dyson, Berger et al. 2018). In der Humanmedizin sind daher Befragung und Selbstauskunft Methoden der Wahl, um diese emotionale Komponente zu quantifizieren (Hjermstad, Fayers et al. 2011). In Ermangelung dieser Möglichkeit bei Tieren muss hierbei primär auf Änderungen im Verhalten zurückgegriffen werden (Dalla Costa, Minero et al. 2014, Gleerup, Forkman et al. 2015). Die Einführung des RHE stellt dabei einen Versuch dar, mit Hilfe einer

ganzen Reihe an Parametern die Schmerz- und Stressbelastung gerittener Pferde zu beurteilen (Dyson, Berger et al. 2018). Das RHE umfasst 24 Aspekte und Verhaltensweisen (Dyson und Pollard 2021), welche über einen Zeitraum von etwa 10 Minuten (Dyson und Pollard 2021) bei gerittenen Pferden erfasst und ausgewertet werden. Das RHE zur Beurteilung schmerzassozierten Verhaltens fand dabei bereits auch bei internationalen Grands Prix im Dressursport und anderen Pferdegroß-veranstaltungen Anwendung (Dyson und Pollard 2021, Dyson und Pollard 2021, Dyson und Pollard 2022). Ein RHE Score von mehr als 8 von 24 wurde dabei als repräsentativ für das Vorhandensein von Lahmheiten oder schmerzhaften muskuloskelettalen Erkrankungen angesehen (Dyson, Berger et al. 2018). Neben muskuloskelettalen Erkrankungen können auch Stress und andere Faktoren, welche das Wohlbefinden des Pferdes beeinträchtigen können, entsprechende im RHE angeführte Verhaltensweisen hervorrufen (Ladewig, McLean et al. 2022). In einem Review über das RHE wurde kritisiert, dass ein Risiko besteht, wichtige andere Aspekte, die Ausdruck eines reduzierten Wohlbefindens beim Pferd sein können, zu übersehen, wenn dieses als einzige Beurteilungsskala eingesetzt wird (Ladewig, McLean et al. 2022). Ein weiterer Kritikpunkt war die gleiche Gewichtung der unterschiedlichen Parameter, ohne dass es einen evidenzbasierten Hintergrund dafür gibt (Ladewig, McLean et al. 2022). Daneben gibt es auch andere Ansätze von Ethogrammen zur Beurteilung gerittener Pferde (Hall, Huws et al. 2013), welche sich jedoch in ihrem Grundprinzip ähnlich sind. Zum Teil wird dabei die Stressantwort in den Vordergrund gerückt (Visser, VanDierendonck et al. 2009). Beispielsweise wurden hierbei stressassoziierte Verhaltensweisen während des Trainings wie Körperspannung, hohe Kopfhaltung, Lippenbewegungen oder Zähneknirschen im Zusammenhang mit unterschiedlichen Trainingsmethoden untersucht, ebenso wie die Häufigkeit, mit der die Pferde mittels Schnauben auf menschliche Annäherung reagierten (Visser, VanDierendonck et al. 2009). Dabei wurde deutlich, dass junge Pferde, welche mit konventionellen Trainingsmethoden trainiert wurden, signifikant mehr stressassoziierte Verhaltensweisen an den Tag legten, als solche, die mit sanfteren Trainingsmethoden trainiert wurden (Visser, VanDierendonck et al. 2009).

2. Nasenriemen

2.1. Definition Nasenriemen

Im Reitsport werden disziplinübergreifend verschiedene Arten von Zaumzeugen eingesetzt. Neben vielen anderen Modellen, wie dem Hannoverschen, dem Mexikanischen, oder dem Englischen Reithalfter, kommt hierbei, vor allem in den olympischen Disziplinen Vielseitigkeit, Dressur und Springreiten, am häufigsten das schwedische Reithalfter zum Einsatz (Visser, Kuypers et al. 2019) (siehe Abbildung 1). Dieses besteht dabei in der Regel aus einem breiten Nasenriemen und einer Umlenkverschnallung, sowie optional einem Sperrriemen. Die häufigsten Gründe für eine Anwendung von Nasenriemen bzw. Sperrriemen liegen, neben vielen anderen, vor allem darin begründet, das Pferd am Öffnen des Mauls und am Rollen der Zunge über das Gebiss zu hindern, das gesamte Erscheinungsbild zu verbessern oder die Regeln der Sportart einzuhalten (Weller, Franklin et al. 2020). Ein weiterer häufig genannter Grund ist zudem, eine bessere Kontrolle über das Pferd zu erlangen (Doherty, Casey et al. 2017, Merkies, Copelin et al. 2022).

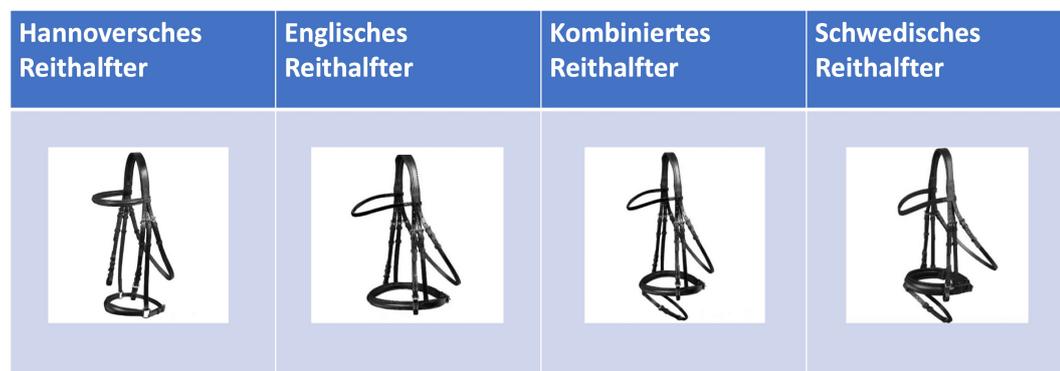


Abb. 1: Die am häufigsten im Reitsport genutzten Reithalfter. Quelle: LPO-Ausrüstungskatalog, Stand 2023. Deutsche Reiterliche Vereinigung (FN)

2.2. Regelung im Reitsport

In Deutschland hat sich auf nationaler Ebene bei Turnieren in Bezug auf Nasenriemen und Sperrriemen die „Ein- bzw. Zwei-Finger-Regel“ etabliert. Diese ist auch in der aktuellen Fassung der Leistungsprüfungsordnung (LPO) von 2023 hinterlegt und besagt, dass bei einem korrekt verschnallten Hannoverschen Reithalfter zwischen Nasenrücken des Pferdes und Nasenriemen mindestens zwei Finger breit Platz sein müssen, bei einem Englischen Reithalfter nur ein Finger (LPO 2023). Außerhalb des Turniersports gilt die Zwei-Finger-Regel ebenfalls als Empfehlung, jedoch ohne rechtliche Grundlage oder Möglichkeit der Überprüfung.

In den Niederlanden wurde am 1. April 2019 eine neue Regelung durch den Königlichen Pferdesportverband der Niederlande (KNHS) implementiert (Visser, Kuypers et al. 2019), welche zwischen Nasenrücken und Nasenriemen einen Mindestabstand von 1,5 cm vorschreibt. Auch in der Schweiz hat der Schweizerische Verband für Pferdesport (SVPS) zum 01.01.2020 diese 1,5 cm-Regelung eingeführt. Insgesamt gibt es auf internationaler Ebene jedoch keine einheitliche Regelung, der internationale Pferdesportverband FEI schreibt in seinen Dressur-Richtlinien lediglich vor, dass Pferden durch zu enge Nasenriemen kein Schaden zugefügt werden darf (FEI 2023) und die Enge des Nasenriemens an der Wange eines jeden Pferdes überprüft werden muss (FEI 2019).

Um den korrekten Sitz des Nasenriemens zu überprüfen, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Namensgebend für die Zwei-Finger-Regel ist dabei, mit zwei Fingern übereinander, den Abstand zwischen Nasenrücken des Pferdes und Nasenriemen zu überprüfen. Eine etwas objektivere Möglichkeit stellt eine von der International Society for Equitation Science (ISES) eingeführte Messschablone dar, welche den Abstand zwischen Nasenrücken und Nasenriemen misst. Eine weitere objektive Messmethode mit einem digitalen Messgerät haben Doherty et al. (2017) vorgestellt (Doherty, Conway et al. 2017).

In jüngerer Vergangenheit haben Studien immer wieder belegt, dass trotz der für Turniere bestehenden Regelung viele Nasenriemen weiterhin deutlich zu eng verschnallt werden. Eine Untersuchung von Doherty et al. (2017) kam zu dem Ergebnis, dass bei 750 auf Turnieren untersuchten Pferden nur 7% einen korrekt verschnallten Nasenriemen aufwiesen (Doherty, Casey et al. 2017), während eine aktuelle Studie unter kanadischen Reitern ergab, dass bei 71% der Pferde die Nasenriemen korrekt nach der Zwei-Finger-Regel verschnallt waren (Merkies, Copelin et al. 2022). Im Gegensatz dazu ergab die Auswertung einer Online-Umfrage zur Nutzung von Nasenriemen, dass unter Reitenden ein verbreitetes Bewusstsein für die Problematik zu enger Nasenriemen besteht, sowie ein allgemeiner Konsens in Bezug auf die Zwei-Finger-Regel herrscht (Clayton und Williams 2022).

2.3. Nasenriemen als Stressor

Zu enge Nasenriemen können eine nicht unerhebliche Stressbelastung für Pferde darstellen und neben physischen Stressreaktionen wie einem Anstieg von

Herzfrequenz (HR) und Augentemperatur und einem Abfall der HRV auch zu Veränderungen im Verhalten führen (Fenner, Yoon et al. 2016). Diese Verhaltensänderungen beinhalten dabei häufig vermehrtes Gähnen, Schlucken und Lecken, nachdem ein zu enger Nasenriemen gelockert wurde, als Zeichen einer postinhibitorischen Verstärkung (Fenner, Yoon et al. 2016). Daneben kommen auch direkte physische Schäden durch die Einwirkung zu enger Nasenriemen vor. Neben Abwehrverhalten der Pferde beim Verschnallen, Schwellungen im Bereich des Nasenrückens, Farbverlust der Haare im Bereich des Nasenriemens oder wunden Stellen ist dabei die am häufigsten berichtete Komplikation ein Haarverlust unter dem Nasenriemen (Weller, Franklin et al. 2020). Darüber hinaus sind auch chronische Veränderungen der knöchernen Anteile des Nasenrückens durch dauerhafte Einwirkung zu enger Nasenriemen nicht ausgeschlossen (Perez-Manrique, Leon-Perez et al. 2020). Zusätzlich ist anzunehmen, dass zu eng verschnallte Nasenriemen auch zu einer nicht unerheblichen emotionalen Stressbelastung der Pferde führen können, da ihnen damit eine wichtige Möglichkeit genommen wird, sich dem Einfluss einer harten Hand des Reitenden zu entziehen.

3. Overground-Endoskopie

Overground-Endoskopien bezeichnen Belastungsendoskopien der oberen Atemwege bei Pferden. Diese können sowohl an der Longe, als auch unter dem Reiter durchgeführt werden und ermöglichen eine bildgebende Darstellung der oberen Atemwege, sowie die Beurteilung von deren Funktion unter körperlicher Belastung. Der Hauptfokus liegt dabei auf der Darstellung des Kehlkopfs und des weichen Gaumens. Im Vergleich zur konventionellen Atemwegsendoskopie wird die Overground-Endoskopie am wachen, unsedierten Pferd durchgeführt und ermöglicht dadurch häufig erst eine klinisch relevante Beurteilung der Funktionalität der oberen Atemwege (Barakzai und Dixon 2011). In der Praxis wird dies häufig eingesetzt, um in Ruhe oder unter Belastung auftretende Atemgeräusche diagnostisch abzuklären. Ebenso kann dabei der Einfluss von Eingriffen des Reiters auf Stabilität und Funktion von Rachen und Kehlkopf dargestellt werden (Pollock, Reardon et al. 2009).

3.1. Overground-Endoskop als Stressor

Über den Einfluss von Overground-Endoskopien auf das Stresslevel oder einzelne

Stressparameter von Pferden gibt es derzeit keine näheren Untersuchungen. Dennoch ist davon auszugehen, dass bereits das Schieben eines Endoskops durch die Nasenhöhle bei nicht sedierten Pferden einen nicht unerheblichen Stressor darstellt, was nicht nur durch regelmäßig auftretendes Abwehrverhalten deutlich wird. Auch die Bewegung bzw. das Reiten mit geschobenem Endoskop verursacht mutmaßlich Stress und Unwohlsein aufgrund des ungewohnten Fremdkörperreizes in Nase und Rachen.



Abb. 2: Pferd mit eingeführtem Overground-Endoskop (links), vollständiges Equipment unter dem Sattel (rechts)

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Zielsetzung

Biochemische Stressparameter in Blut oder Speichel dienen als wesentlicher Bestandteil zur Objektivierung und Erfassung von Stressreaktionen bei Pferden. Ziel dieser Studie war, neben Alpha-Amylase im Serum, vor allem Substanz P im Plasma auf seine Eignung als Stressparameter, besonders im Hinblick auf emotionalen Stress, zu untersuchen und mit etablierten Stressparametern in einem definierten Stressmodell zu vergleichen.

2. Stressparameter

Im Vorfeld der unter III.3. beschriebenen Studie wurden zahlreiche Voruntersuchungen im Hinblick auf die ausgewählten Stressparameter in Blut und Speichel durchgeführt, um geeignete Methoden, Umstände und Zeitpunkte der Probenentnahmen zu evaluieren. Im Folgenden werden die Ergebnisse aus diesen Voruntersuchungen, sowie Ergebnisse im Rahmen der Studie ergänzend zur unter 3. genannten Publikation dargestellt.

2.1. Alpha-Amylase

Zu Alpha-Amylase wurden die umfangreichsten Voruntersuchungen durchgeführt, da sich dieser Parameter zunächst sehr inkonstant in seiner Messung zeigte. Im Vorfeld wurden sowohl Speichel- als auch Serumproben von sechs adulten, gesunden Warmblutpferden in Ruhe auf ihre Alpha-Amylase Aktivität untersucht. Die Serumwerte lagen dabei zwischen 4,1 U/l und 9,0 U/l, die Werte im Speichel zwischen 0 und 12,9 U/l. Dabei korrelierten Serum- und Speichelwerte nicht, das Pferd mit dem höchsten Serumwert wies nicht die höchste Alpha-Amylase Aktivität im Speichel auf und umgekehrt (Tabelle 1). Allgemein zeigten sich auch bei Folgeuntersuchungen derselben Individuen unter gleichen Bedingungen die Serumwerte konstanter und im Durchschnitt höher als die Aktivität im Speichel, während oftmals die Werte aus den Speichelproben unterhalb des validierten Messbereichs (3-1500 U/l) lagen. Individuen mit einem höheren Grad an Stress durch Handling und Blutprobenentnahme wiesen eine höhere Aktivität von Alpha-Amylase im Serum auf, im Speichel war kein Unterschied feststellbar.

Pferd Nr.	Alpha-Amylase Serum in U/l	Alpha-Amylase Speichel in U/l
1	4.2	n.m.
2	9.0	2.9
3	8.6	2.0
4	4.1	n.m.
5	6.2	10.1
6	6.4	12.9

Tabelle 1: Aktivitäten von Alpha-Amylase in U/l in Serum und Speichel von sechs adulten, gesunden Warmblutpferden in Ruhe im Rahmen der ersten Voruntersuchung (n.m.=nicht messbar)

Weiterhin wurde der Einfluss der zirkadianen Rhythmik auf die Aktivität von Alpha-Amylase beleuchtet. Hierzu wurden Speichel- und Serumproben von zwei adulten, gesunden Warmblutpferden in Ruhe um 8 Uhr morgens, um 16 Uhr und um 8 Uhr morgens des Folgetags entnommen. Die Resultate ergaben kaum Schwankungen der Werte im Tagesverlauf.

Des Weiteren wurde die Aktivität von Alpha-Amylase im Serum und Speichel im Zusammenhang mit der Futteraufnahme überprüft. Hierbei wurden Serum- und Speichelproben von zwei adulten, gesunden Warmblutpferden einmal morgens nüchtern vor dem Füttern genommen und jeweils eine zweite Probe direkt nach dem Fressen. Die Serumwerte waren erneut sehr konstant und zeigten durch die vorangegangene Nahrungsaufnahme nur einen geringen Anstieg (z.B. von 6,0 U/l auf 6,7 U/l oder von 4,4 U/l auf 4,5 U/l), die Aktivität von Alpha-Amylase im Speichel jedoch ergab deutliche Anstiege nach Nahrungsaufnahme (von 6,1 U/l auf 22,7 U/l oder von 3,5 U/l auf 52,0 U/l).

Eine weitere Voruntersuchung wurde im Rahmen der Blutprobenentnahme für diagnostische Zwecke bei Pferden, die aufgrund von unterschiedlicher Koliksymptomatik in der Klinik vorgestellt wurden, durchgeführt (n=37). Die Schwere der Koliksymptome wurde hierbei in geringgradig (ggr.), mittelgradig (mgr.) und hochgradig (hgr.) eingeteilt. Es wurden ausschließlich Serumproben auf deren Alpha-Amylase Aktivität untersucht (Tabelle 2), wobei die Ergebnisse eine enorme Schwankungsbreite zwischen 1,4 U/l und 1226,3 U/l ergaben. Der Großteil der beprobten Pferde (77%) wies dabei jedoch einstellige Alpha-Amylase Aktivitätswerte auf und somit Werte in einem vergleichbaren Bereich, wie die Pferde aus der gesunden Testgruppe (Tabelle 1).

Ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Alpha-Amylase Aktivität und der Schwere der Koliksymptome konnte dabei nicht hergestellt werden.

Pferd Nr.	Alpha-Amylase Serum in U/l	Schwere der Koliksymptome
1	4.8	mgr.
2	270.9	mgr.
3	131.9	mgr.
4	5.8	ggr.
5	10.4	mgr.
6	3.4	mgr.
7	5.5	ggr.
8	18.4	ggr.
9	1.9	ggr.
10	3.8	ggr.
11	2.8	mgr.
12	14.2	hgr.
13	8.2	hgr.
14	73.9	hgr.
15	2.4	mgr.
16	3.8	mgr.
17	4.8	hgr.
18	6.9	mgr.
19	1.5	mgr.
20	18.2	mgr.
21	7.9	hgr.
22	5.4	mgr.
23	4.0	mgr.
24	4.4	mgr.
25	13.3	ggr.
26	9.0	ggr.
27	4.4	hgr.
28	1.4	hgr.
29	4.5	mgr.
30	1226.3	hgr.
31	7.0	ggr.
32	5.8	mgr.
33	4.2	ggr.
34	6.6	ggr.
35	3.5	hgr.
36	4.8	mgr.
37	5.3	ggr.

Tabelle 2: Aktivitäten von Alpha-Amylase in U/l im Serum von 37 Warmblutpferden mit geringgradigen, mittelgradigen und hochgradigen Koliksymptomen

Die Ergebnisse aller Voruntersuchungen zeigten insgesamt, dass die Messung von Alpha-Amylase im Speichel als Stressmarker sehr inkonstant mit stark schwankenden Aktivitätswerten ist, welche deutlich stärker von unmittelbar vorausgegangener Nahrungsaufnahme beeinflusst schien, als im Zusammenhang mit stressbedingten Ereignissen. Die Aktivitätswerte im Serum stellten sich konstanter und unabhängiger von der Nahrungsaufnahme dar, weshalb in der Studie nur auf eine Messung der Alpha-Amylase Aktivität im Serum zurückgegriffen und auf die Speichelproben verzichtet wurde, auch wenn bislang die Eignung von Serum-Alpha-Amylase als Stressmarker nur beim Menschen beschrieben ist (Mandal, Bhattacharjee et al. 2019).

Die Gewinnung der Serumproben zur Bestimmung der Alpha-Amylase Aktivität im Rahmen der durchgeführten Studie erfolgte analog zur Gewinnung der Serumproben zur Cortisol-Bestimmung (siehe III.3.). Die Alpha-Amylase Aktivität wurde schließlich photometrisch mit Hilfe eines COBAS-Analysesystems (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) gemessen.

Zur Etablierung von Referenzwerten von Alpha-Amylase im Serum bei Pferden wurden die Aktivitätswerte im Serum aller Pferde aus der Studie zum Zeitpunkt t_0 in Ruhe, sowie die Werte der Kontrollgruppe herangezogen (siehe III.3.). Hierbei lag die Alpha-Amylase Aktivität durchschnittlich bei $2,7 \pm 0,7$ U/l und damit unterhalb des für den verwendeten Test validierten Messbereichs (3-1500 U/l). Die Aktivitätswerte nach Stressinduktion waren im Durchschnitt mit $3,1 \pm 0,7$ U/l geringgradig höher und knapp oberhalb des validierten Messbereichs.

Bei dem in der Studie verwendeten Stressmodell gab es außerdem keine Korrelation zwischen der Alpha-Amylase Aktivität und den Cortisol-Konzentrationen im Serum. Während die Konzentration von Cortisol im Serum mit der Stärke des Stressors anstieg und sich signifikant zwischen Stresslevel 1 und 4 unterschied, zeigte die Alpha Amylase-Aktivität keine Tendenz eines signifikanten Anstiegs mit zunehmender Intensität des Stressors.

2.2. Substanz P

Zur Messung der Substanz P-Konzentration im Serum wurden ebenfalls Voruntersuchungen durchgeführt. Zum einen wurden hierbei Aprotinin-Plasmaproben von 20 Pferden mit unterschiedlich schweren Koliksymptomen im Rahmen der Blutprobenentnahme für diagnostische Zwecke auf deren Substanz P-Konzentration untersucht, zum anderen von sechs adulten, gesunden Warmblutpferden. Grundsätzlich ließen sich Substanz P-Konzentrationen aus allen Plasmaproben bestimmen, diese schwankten dabei interindividuell jedoch erheblich zwischen 521,84 pg/ml und 6048,74 pg/ml. Die vergleichsweise geringe Probenanzahl und die nicht restlos übereinstimmenden Probenentnahmeprotokolle ließen dabei vorerst noch keinen direkten Schluss auf die Eignung von Substanz P als Stressparameter beim Pferd zu, was schließlich im Rahmen der Durchführung der Studie angestrebt wurde.

Zur Etablierung von Referenzwerten für Konzentrationen von SP im Plasma bei Pferden wurden im Rahmen der Durchführung der Studie 74 Ruhewerte

herangezogen (siehe III.3). Die Pferde zeigten dabei eine sehr große interindividuelle Schwankungsbreite der SP-Plasmakonzentrationen bei einem Mittelwert von 2472 pg/ml mit einer Standardabweichung von 1643 pg/ml. Bei einzelnen Individuen hingegen blieben die SP-Werte in engeren Bereichen (intraindividuelle Variation). Dazu wurden die jeweiligen Nullproben (t0) der 16 Pferde der Studiengruppe im Vergleich analysiert (siehe Tabelle 3).

Pferd Nr.	Mittelwert	Standardabweichung	IQR	Medianwert
1 (n=4)	2492.1	513.4	776.5	2533.4
2 (n=4)	2712.6	432.9	571.9	2812.1
3 (n=4)	1232.1	550.6	774.5	1177.2
4 (n=4)	1138.9	173.9	238.2	1103.5
5 (n=4)	1269.7	123.7	137.3	1232.2
6 (n=4)	2263.7	81.0	96.8	2279.3
7 (n=4)	1046.8	86.6	101.9	1062.2
8 (n=4)	843.8	74.5	95.9	852.1
9 (n=4)	4786.4	470.1	620.1	4722.5
10 (n=4)	1942.5	367.0	427.6	1948.4
11 (n=4)	2378.9	588.2	630.6	2178.3
12 (n=4)	1398.4	158.3	171.5	1416.8
13 (n=4)	6132.6	1920.4	1235.7	6528.9
14 (n=4)	4409.5	1860.0	2403.1	3973.8
15 (n=4)	1990.6	484.7	456.0	2101.4
16 (n=4)	4817.9	964.6	1408.9	4671.5

Tabelle 3: Plasmakonzentrationen von Substanz P in pg/ml aller 16 Pferde der Studiengruppe der vier verschiedenen Stresslevel zum Zeitpunkt t0. Dargestellt sind individuelle Mittel- und Medianwerte sowie die intraindividuelle Standardabweichung (SD) und der Interquartilsabstand (IQR). Bei einzelnen Pferden ist dabei die SD geringer als die Variation zwischen den Pferden (interindividueller Vergleich).

Ähnlich wie bei der Alpha-Amylase Aktivität gab es auch zwischen den SP-Plasmakonzentrationen und den Cortisol-Konzentrationen im Serum im verwendeten Stressmodell keinerlei Korrelationen. Die gemessenen SP-Werte ließen zudem keine Rückschlüsse auf die Stärke der unterschiedlichen Stresslevel zu und es war kein Trend erkennbar. Weder ein statistisch signifikanter Unterschied im Hinblick auf die akute Stressreaktion (SP-Konzentration zwischen Zeitpunkt 0 (t0) und Zeitpunkt 1 (t1)) nach Verschnallen des Nasenriemens oder Schieben des Overground-Endoskops, noch ein signifikanter Unterschied der Substanz P-Konzentrationen zwischen t0 und Zeitpunkt 2 (t2; nach dem Reiten) war hierbei nachweisbar.

2.3. Cortisol

Auch zu Cortisol wurden vor der eigentlichen Studie Voruntersuchungen

durchgeführt, indem Serum- und Speichelproben von fünf adulten, gesunden Warmblutpferden entnommen und auf deren Cortisol-Konzentration untersucht wurden (Tabelle 4). Die Ergebnisse dieser Voruntersuchung zeigten eine konstant gute Messbarkeit von Cortisol in Serum und Speichel, die Schwankung innerhalb von Doppelproben war gering und die Messungen der Cortisol-Konzentration im Speichel diente auch der Optimierung der Probenentnahmemethode der Speichelproben.

Pferd Nr.	Cortisol Speichel in ng/ml	Cortisol Serum in ng/ml
1	4.50	39.15
1	6.24	24.90
2	30.09	27.80
2	39.51	26.90
3	n.m.	25.59
3	5.40	12.29
4	26.90	28.71
4	25.12	24.29
5	6.60	20.59
5	11.42	26.10

Tabelle 4: Cortisol Konzentrationen in ng/ml in Speichelproben von 5 gesunden Warmblutpferden im Rahmen der Voruntersuchung, jeweils im Doppelansatz

Im Rahmen der Studie (siehe III.3) wurden bei den untersuchten Pferden Cortisol-Konzentrationen sowohl im Serum, als auch aus dem Speichel bestimmt. Hierbei zeigte Cortisol im Serum einen linearen Anstieg, welcher mit der Intensität der vier Stresslevels einherging, wobei die Cortisol-Konzentrationen von 56,4 ng/ml bis 150,4 ng/ml reichten. Die niedrigsten Cortisol-Gesamtkonzentrationen wurden bei Pferden bei Stresslevel 1 gemessen, während Stresslevel 4 die höchsten Konzentrationen aufwies. Während der Anstieg von Cortisol bei Pferden, die ohne Endoskop geritten wurden (Stresslevel 1 und 2), nicht signifikant war, gab es eine Tendenz zu einem statistisch signifikanten Anstieg zwischen Stresslevel 3 und 4. Der Vergleich von Stresslevel 1 mit Stresslevel 4 zeigte darüber hinaus einen signifikanten Anstieg der Serum Cortisol-Konzentrationen ($p = 0,043$).

Die Speichelproben für die Cortisol-Analyse wurden zu zwei Zeitpunkten gesammelt, die Nullprobe (t_0) im Stall und die zweite Probe nach dem Reiten (t_2) jeweils zusammen mit den Blutproben. Der Speichel wurde mit einem Schwamm gesammelt, der für mindestens eine Minute in das Maul des Pferdes in das Diastema eingeführt wurde. Der Schwamm wurde dann in eine Sammelvorrichtung

(Salivette, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland (Abb.3)) gegeben und bei 4000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Die gewonnenen Proben wurden in 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen überführt und vor Ort auf Trockeneis gelagert, bevor sie schließlich endgültig bis zur weiteren Analyse bei -20 °C eingefroren wurden. Die Cortisol-Bestimmung aus den Speichelproben erfolgte mittels eines Speichel-Cortisol-ELISA-Kits (DRG International Inc., Springfield, NJ, USA) mit einer Sensitivität von 0,09 ng/ml.

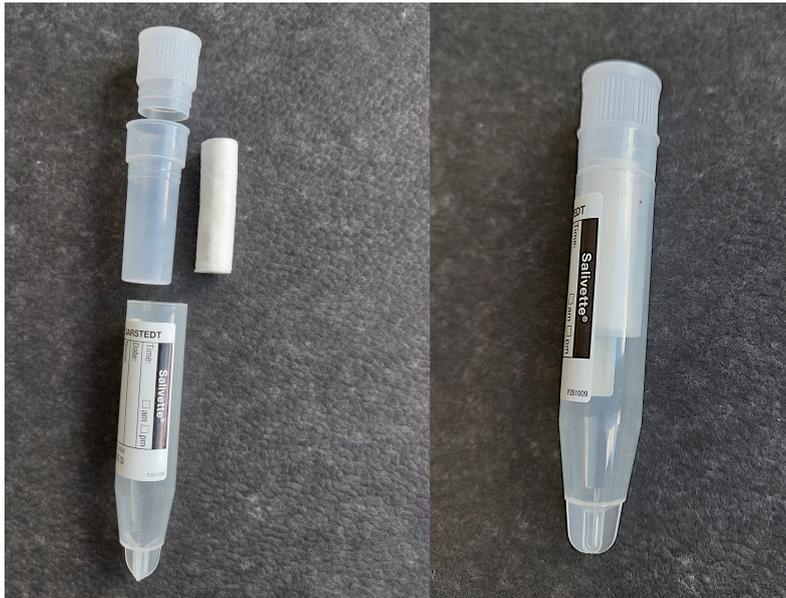


Abb. 3: Salivette links in Einzelteilen mit Schwamm, rechts zusammengefügt

Die Cortisol-Konzentrationen im Speichel korrelierten weniger gut mit dem Stressmodell, als die Serumwerte. Stresslevel 3 wies im Durchschnitt mit 3,0 ng/ml die höchsten Konzentrationen auf, während die Nullwerte im Mittel höher lagen als die Konzentrationen nach Belastung bei Stresslevel 1. Insgesamt reichten die gemessenen Cortisol-Konzentrationen nach Belastung im Speichel von 0,09 ng/ml bis 7,75 ng/ml (Tabelle 5). Die Bestimmung aus dem Speichel erwies sich als vergleichsweise schwierig, da trotz genauer Einhaltung eines Probenentnahmeprotokolls 11,5 % der Proben (n=17) aufgrund zu geringen Probenvolumens oder zu starker Kontamination nicht auswertbar waren.

Pferd Nr.	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4
1	1,23	2,70	2,32	n.m.
2	1,18	2,46	1,06	1,94
3	1,30	0,94	4,57	3,06
4	2,61	3,33	4,64	6,94
5	1,36	n.m.	n.m.	6,43
6	1,25	1,67	2,41	1,39
7	2,13	1,22	1,86	5,21
8	1,04	1,49	3,47	1,90
9	1,42	1,32	0,38	1,23
10	n.m.	3,38	1,30	2,27
11	4,88	1,60	4,15	n.m.
12	2,17	n.m.	2,81	0,09
13	0,52	0,58	3,14	n.m.
14	1,48	1,76	2,58	3,19
15	1,58	2,25	7,75	0,40
16	0,10	2,25	n.m.	1,58

Tabelle 5: Cortisol Konzentrationen in ng/ml in Speichelproben der Studiengruppe der vier Stresslevel zum Zeitpunkt t2 nach Belastung (n.m.=nicht messbar)

Zwischen den Serum-Cortisol-Konzentrationen und dem RHE-Score gab es keine signifikanten Korrelationen, wenn gemäß dem RHE nach Dyson et al. (2018) die Anzahl der von den Pferden gezeigten Parameter berücksichtigt wurde. Hohe Cortisol-Konzentrationen stimmten dabei nicht mit den höchsten RHE-Scores überein und umgekehrt und gleiches galt für niedrige Cortisol-Konzentrationen und die niedrigsten RHE-Scores.

2.4. Heart Rate Variability (HRV)

Zur Analyse der HRV wurde im Rahmen der Studie (siehe III.3) bei allen Pferden während des Reitens ein Elektrokardiogramm (EKG) durchgeführt. Vor dem Satteln wurden hierzu bei allen Pferden EKG-Elektroden an der linken Brustwand angebracht. Anschließend wurden die Pferde zum Reitplatz geführt, wo das EKG angeschlossen und ein Ruhe-EKG für fünf Minuten aufgezeichnet wurde. Während des Reitens wurde schließlich ein Belastungs-EKG aufgezeichnet, dessen Daten später für die HRV-Analyse verwendet wurden. Die EKGs wurden mit einem Teletet 100 Gerät (Engel Engineering Service GmbH, Heusenstamm, Deutschland) aufgezeichnet und die HRV wurde mit der Kubios HRV Premium Software 3.5.0 (Kubios Oy, Kuopio, Finnland) analysiert, wobei beat-to-beat-Intervalle importiert wurden, um daraus eine HRV-time-domain Analyse (siehe II.1.4.) zu berechnen.

Hinsichtlich der HRV wurden nur die Daten zu Stresslevel 1 und 2 ausgewertet, um

alleine den Einfluss des Nasenriemens ohne zusätzliches Endoskop auf die Herzfrequenzvariabilität zu analysieren. Hierbei zeigte sich, dass die HRV bei Pferden mit engem Nasenriemen im Durchschnitt niedriger war (SDNN $19,2 \pm 7,4$ ms; RMSSD $9,9 \pm 4,3$ ms), als bei Pferden mit weitem Nasenriemen (SDNN $21,1 \pm 13,5$ ms; RMSSD $12,4 \pm 8,8$ ms). Die Werte waren hierbei allerdings jeweils interindividuell sehr weit gestreut und der Unterschied zwischen den Stresslevels nicht signifikant (SDNN $p=0,114$; RMSSD $p = 0,228$).

2.5. Ridden Horse Ethogram (RHE)

Beim Vergleich der RHE-Scores der Studie (siehe III.3) zwischen den verschiedenen Stresslevels wurde ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0003$) zwischen den Pferden festgestellt, welche mit weiten und engen Nasenriemen geritten wurden, unabhängig davon, ob sie zusätzlich mit Endoskop geritten wurden, oder ohne. Während die Gruppe mit weiten Nasenriemen hauptsächlich Verhaltensänderungen in Form von Neigen und Schiefhalten des Kopfes, Tragen des Kopfes vor der Senkrechten und Öffnen des Mauls demonstrierten, zeigten die Pferde, die ihr Maul aufgrund des engen Nasenriemens nicht öffnen konnten, hauptsächlich Verhaltensmuster wie einen hinter der Senkrechten getragenen Kopf, nach hinten gedrehte Ohren, geschlossene Augenlider, eine sichtbare Sklera, sowie intensives Starren. Diese Parameter werden beim Pferd allgemein mit „erlernter Hilflosigkeit“ beschrieben (Hall, Goodwin et al. 2008), die als Reaktion auf einen Stressor, dem das Pferd nur mit Resignation begegnen kann, interpretiert wird. Das Vorhandensein vieler RHE-Parameter korrelierte auch mit dem Eindruck der Reiter, dass die Pferde unabhängig vom Endoskop unzufriedener mit einem engen Nasenriemen waren.

3. Publikation

In Animals wurde folgende Publikation am 24.03.2023 veröffentlicht:



Article

Evaluation of Substance P as a New Stress Parameter in Horses in a Stress Model Involving Four Different Stress Levels

Dominik Scholler ¹, Yury Zablotki ²  and Anna May ^{1,*}¹ Equine Hospital, Ludwig Maximilians University, 85764 Oberschleissheim, Germany² Clinic for Ruminants with Ambulatory and Herd Health Services, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig Maximilians University, 85764 Oberschleissheim, Germany* Correspondence: anna.may@pferd.vetmed.uni-muenchen.de

Simple Summary: The public perception of animal welfare in equestrian sports depends on factors associated with training methods and presentation of horses at equestrian events. Regarding this, correctly buckled nosebands have played an important role in recent years. Furthermore, methods were required to objectify stress and anxiety reactions in horses. Besides cortisol measurements, ridden horse ethograms were developed to quantify adverse reactions and pain-related behavior in the ridden horse. The main aim of the study was to evaluate substance P (SP) as a new stress parameter mainly addressing emotional stress reactions. Other objectives were to establish reference values for SP in horses and to compare concentrations to the established stress parameter cortisol. A ridden horse ethogram was used to simultaneously evaluate obvious adverse reactions. Plasma concentrations of SP showed large interindividual variations, whereas they stayed within more narrow ranges in individual horses. While cortisol showed a linear increase with the four applied stress levels (level 1: horses ridden with loose noseband, level 2: tight noseband, level 3: loose noseband and overground endoscope, level 4: tight noseband and overground endoscope), SP showed no correlation and may therefore be not suitable to quantify emotional stress in horses in the present minor stress model.



Citation: Scholler, D.; Zablotki, Y.; May, A. Evaluation of Substance P as a New Stress Parameter in Horses in a Stress Model Involving Four Different Stress Levels. *Animals* **2023**, *13*, 1142. <https://doi.org/10.3390/ani13071142>

Academic Editor: Giuseppe Piccione

Received: 12 February 2023

Revised: 15 March 2023

Accepted: 22 March 2023

Published: 24 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Stress has a significant impact on equine welfare. There are some studies on the stress response in horses ridden with tight nosebands, but little is known about other stress parameters than cortisol, which potentially could address an emotional component. In this study, blood samples of a total of 74 warmblood horses were used to establish reference values for plasma substance P (SP) concentrations. Moreover, 16 of these warmblood horses were included in a stress model. Four different stress levels (level 1: horses ridden with loose noseband, level 2: tight noseband, level 3: loose noseband and overground endoscope, level 4: tight noseband and overground endoscope) were applied to evaluate SP as a potential stress parameter in horses. Blood samples were taken at rest (t_0) and directly after inducing stress (noseband tightening, insertion of endoscope; t_1), as well as after 20 min of riding at all gaits (t_2). A ridden horse ethogram was applied and showed that horses in the tight noseband group resorted to other stress-related behavioral issues than horses with loose nosebands. Serum cortisol showed a linear increase concurrent with the increase in stress levels with a significant difference between level 1 and level 4 ($p = 0.043$), proving that stress factors were adequate to evaluate the stress response, whereas SP did not show a correlation with the stress levels. Furthermore, concentrations of SP differed widely between horses but stayed within more narrow limits in the individual horse. As a conclusion, SP might not be a reliable stress parameter in horses in the applied minor stress model.

Keywords: noseband; equine; stress; cortisol; substance P; ridden horse ethogram; overground endoscope

1. Introduction

In the past years, equestrian sport has repeatedly received public criticism due to controversial training methods [1]. In this context, the often very tightly buckled nosebands, which are intended to prevent the horse from opening its mouth in response to a hard hand impact, as well as from laying the tongue over the bit or sticking it out to the side, also attracted a lot of attention [2,3]. Since the horse is thus deprived of any withdrawal from a hard rider's hand, it is a frequent point of criticism and does not correspond to the guidelines of the equestrian sport associations. The guidelines of the German Equestrian Federation (Fédération Equestre Nationale; FN) recommend that two fingers of an adult should be placed between the noseband and the bridge of the nose of the horse. However, this is not always met in practice [4,5]. Various studies have evaluated the impact of tight nosebands on so-called stress parameters, such as cortisol, heart rate variability and eye temperature measured by infrared thermography, as well as horses' behavior [4,6,7]. In these studies, it was evident that a very tight noseband caused physiological stress responses due to its restraining nature and inhibited the expression of oral behaviors (swallowing, licking), which were increased after removal of the noseband [6].

Several studies also examined the connections between different training methods, head positions, fastening of the noseband and use of auxiliary reins with stress and anxiety behavior in horses by measuring cortisol, eye and facial skin temperature or heart rate variability [4,6,8–13]. In this context, a ridden horse ethogram (RHE) was developed which aimed to evaluate stressful and painful conditions in ridden horses by interpreting their facial expressions and body language [14,15].

Furthermore, for making stress situations in horses more objectifiable on a biochemical level, a call for suitable parameters has been made. Cortisol is the main stress parameter known to increase after stressful events [16], but little is known about its association with emotional stress [17]. In this study, the usability of substance P (SP) as a stress parameter in horses was evaluated. The neuropeptide SP was shown to be a good stress parameter in human medicine, indicating predominantly emotional- and anxiety-related stress. SP has been connected to a variety of pathophysiological processes including stress regulation and affective- and anxiety-related behavior [18]. SP is a neuropeptide composed of eleven amino acids. It is localized both inside and outside the central nervous system and plays an important role in the control of neuronal activity, secretory processes, smooth muscle activity and the regulation of blood pressure [19]. Its predominant location in the central nervous system, the amygdala [20], plays an important role in the processing of fear, anxiety and other emotions [18,21]. SP and its preferred neurokinin 1 receptor (NK1-R) have been found in brain areas that are known to be involved in stress and anxiety responses. SP is predominantly found in primary afferent neurons and is mainly produced by sensory neurons with unmyelinated fibers, which is why it is thought to play a role in pain perception [22]. Furthermore, SP is also formed by immune cells and covers a pro-inflammatory role [23]. SP can act both in a regulatory and a modulating way. The regulatory function seems to be closely linked to endogenous opioids and catecholamines and is therefore closely related to parameters associated with pain and stress [19]. As a result of exposition to stressful stimuli, a change in SP brain tissue content has repeatedly been shown. In human medicine SP was demonstrated to increase, especially with emotional stressors, and this effect depended on the severity of the stressor [18]. This reaction was also assessed in rats and showed similar results [21]. Evidence exists regarding anxiolytic effects when neurokinin 1 receptors were blocked, and SP could not exert its functions [24]. Due to its role in stress and anxiety modulation, SP and its receptor have also been discussed in the treatment of anxiety disorders and depression [21]. SP seems to exert an anti-stress effect by modulation of both biosynthesis and release of catecholamines in the adrenals, which maintain homeostasis in the catecholamine system [25]. Furthermore, SP and cortisol are unquestionably related in the stress response, because the release of SP in response to a stressor activates the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis and triggers anxiogenic effects that result in the release of cortisol from the adrenal glands [26]. Other data show that

SP does not inhibit the initial magnitude of the HPA axis response to stress but ameliorates the effect through neurokinin-1 receptors at a central level to reduce the duration of the stress response. This may be of importance in the control of transition between acute and chronic stress [27].

SP has been investigated in several studies among different species. In humans for example, the role of SP in the immune response [28,29], in wound healing [30] or its association with cardiovascular disease [31] has been described. In veterinary medicine, SP as a biomarker for objectifying pain as a stressor has so far been investigated primarily in cattle and has been identified as a suitable parameter in various studies [32–35]. In a study with calves, which showed a significant increase in the plasma concentration of SP to an average of 506.43 \pm 38.11 pg/mL [35] after castration, SP was identified as one of the most specific biomarkers for pain in cattle [34]. Studies of the stress and pain response in dairy cows with lameness [34] or clinical metritis [33] also showed a significant increase in SP in affected animals. The maximum SP plasma concentrations were 2.20 \pm 0.47 ng/mL [34] and 47.15 \pm 5.38 ng/mL [33]. The clearly heterogeneous and different values of the concentrations in different studies have already been pointed out [32]. Other studies focused on SP as a marker in feline defensive rage behavior [36]. In rodents, increases in SP in the medial amygdala resulted in anxiety-related behavior [37].

There are different studies in horses that have dealt with SP, including as a neurotransmitter in the intestine [38] or as an agent involved in the synovia in joint diseases [39,40]. One study evaluated SP and other stress markers in Tennessee Walking Horses wearing wedge pads and chains on their forefeet for five days and found no increase in concentration [41]. To date, however, there have been only limited studies on SP as a marker in connection with pain or stress in horses.

The present study intended to collect further objective data on the usability of SP as a possible emotional stress parameter in horses by using a four-level stress model. Cortisol regarded as one of the gold standards of stress evaluation in horses was determined in serum. The ridden horse ethogram (RHE) invented by Dyson et al. (2018), which comprises 24 equine behaviors displayed by horses showing musculoskeletal pain and discomfort was also applied [28]. A ridden horse ethogram score $\geq 8/24$ indicates pain and discomfort. This study's design intended to evaluate the differences in the RHE in the same horses ridden four times in different settings.

For the stress model, insertion of an overground endoscope was used in addition to the described tight nosebands. Overground endoscopy is an advanced imaging technique to diagnose airway problems in exercising horses by making evaluation of upper airways possible during riding. The overground endoscope is placed in the nostril and secured to the head with a dedicated bridle. The system accompanying the endoscope is mounted underneath the horses' saddle. Overground endoscopy is particularly useful in horses with upper respiratory noise and has been established as a valuable diagnostic method [42]. Most horses tolerate the procedure very well, but some may show signs of discomfort. Therefore, it was hypothesized that riding with an inserted overground endoscope would trigger a stress response in the horses.

The main aims of the study were to assess the effects of a four-level stress model on established stress parameters such as cortisol and the ridden horse ethogram to verify the stress model, and to compare them with the new parameter SP to assess its context with emotional stress in horses.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

In this study, for the stress model an experimental group of 16 warmblood horses, consisting of 12 mares and 4 geldings with an average age of 11.63 \pm 3.53 years, was used. The horses were part of the teaching horses' group of Bavaria's Main State Stud farm "Haupt- und Landgestuet Schwaiganger" in Ohlstadt, Germany and were all kept under the same husbandry conditions. Every horse was subjected to a detailed clinical

examination and only healthy animals without signs of pain, stress or lameness were used for this study. The control group consisted of 10 horses, 6 mares and 4 geldings with an average age of 13.7 ± 5.68 years, in which blood samples were taken three times according to the sampling of the study group.

Additionally, for establishing reference SP values 48 warmblood horses of any age (12.4 ± 4.6 years), and sex (29 mares, 16 geldings, 3 stallions) were sampled once as well as the 16 experimental group horses and the 10 control group horses (a total of 74 horses).

The animal study protocol was approved by the government of Bavaria (Oberbayern), Munich, Germany (approval AZ ROB-55.2-2532.Vet_02-21-100, February 2022).

2.2. Sampling Methods

Blood samples were taken via jugular venipuncture (20 mL) using 20 G needles (0.9×40 mm). For cortisol, the blood was immediately transferred into serum tubes after venipuncture and centrifuged ($2000 \times g$ for 10 min) after 20 min. For SP vacutainers with aprotinin (BD vacutainer blood collection tubes, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) were used, and the blood was centrifuged at $3500 \times g$ for 15 min immediately after sampling. Serum and aprotinin plasma were harvested after centrifugation, transferred into 1.5 mL Eppendorf tubes, and stored on dry ice on site until being finally stored at -20 °C until analysis. Blood samples were taken at three different time points. The zero samples (t_0) for cortisol and SP were taken in the stables in the morning of each day before further handling of the horses. The second blood sample (t_1) for SP was then taken in the riding arena before riding, tightening the nosebands or administering the overground endoscope. The third blood sample for cortisol and SP (t_2) was taken after stress induction when riding was finished after 20 min.

Sampling in the control group was overall performed analogical to the treatment group, meaning three time intervals t_0 – t_2 , each one hour apart, were used. Blood samples were taken at rest in the morning in the stables and processing of the samples was performed as described above. The reference group was sampled once in the morning at rest in the stable.

2.3. Experimental Procedure

In the stress model for comparison of SP, cortisol and RHE, each horse was ridden a total of four times on four different days within one week. Overall, there were four types of riding the horses which represent the four stress levels (Figure 1). Level 1 was defined by riding with a loose noseband and no endoscope, level 2 by a tight noseband and no endoscope, level 3 included riding with a loose noseband and inserted endoscope and level 4 with a tight noseband and endoscope in place. Every single horse was ridden in all the four stress levels only once. Riding was performed by a total of two professional riders with similar body conditions and riding style. Care was taken that the horses were ridden by the same rider during the experiment over the different days as the riders had to give an assessment of rideability, suppleness, willingness to perform of the horse and general riding feeling after every ride.

As described above, the sampling of the t_0 blood was performed in the morning of each day in the stables, while the horses were at rest and relaxed. After sampling was completed, the horses were successively prepared for riding and led to the riding arena. When riding with overground endoscope, the horses were prepared with the necessary equipment in the stables, apart from administering the endoscope. The t_1 blood samples were taken in the riding arena following administering the overground endoscope, and/or tightening the noseband or immediately before starting of riding when ridden without endoscope and with loose noseband. When ridden with loose nosebands, compliance with the two-finger rule was ensured, meaning that there was a minimum of space between the bridge of the nose and the noseband that two fingers could easily be placed in between them. When ridden with tight nosebands, the nosebands were tightened so much that there was no space between the bridge of the nose and the noseband left. Every horse was ridden in each riding type for 20 min at all gaits. While riding, videos of overground endoscopy

and videos for RHE analysis were taken. After riding was finished, the t2 samples were obtained and the horses were brought back into their stables.



Figure 1. The four levels of stress induction used in this study.

For establishing SP reference values, blood samples were taken from a total of 74 healthy adult warmblood horses at their stables at rest.

2.4. Ridden Horse Analysis

RHE scores were analyzed using the RHE scoring system as described by Dyson et al. (2018) [14]. Every horse was filmed while riding and the videos were analyzed afterwards independently by two equine medicine specialists. The RHE score can range from 0–24, where a score of ≥ 8 is likely to indicate musculoskeletal pain [14]. Apart from musculoskeletal pain, stress and other suboptimal welfare conditions can result in the same behaviors listed in the RHE [43].

2.5. Analysis of Cortisol and Substance P

Substance P was measured using an SP ELISA kit (colorimetric competitive immunoassay kit; Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA) with a sensitivity of 38.48 pg/mL that has been validated in bovine species [32,44] and previously been used in equines [41]. Additionally, according to manufacturer's information, this assay is referred to as species independent for detection of SP in various body fluids. The ELISA was performed according to the manufacturer's instructions and as described by Coetzee et al. (2008). A total of 50 μ L of assay buffer was added to the nonspecific-binding and zero-standard wells, in duplicate. After that, 50 μ L of the appropriate standard diluent and 50 μ L of the sample were added to the appropriate wells. Thereafter, 50 μ L of assay buffer was added to the nonspecific-binding wells. Following that, each well except for the total activity (TA) and blank wells received 50 μ L of conjugate (alkaline phosphatase conjugated with SP) followed by 50 μ L of antibody (rabbit polyclonal antibody to SP). Plates were then incubated at 22 °C on a plate shaker for 2 h at approximately 500 revolutions/min. Following incubation, contents of each plate were discarded, and wells were washed 3 times (400 μ L of wash solution for each wash). After washing, wells were emptied, and plates were tapped on a paper towel to remove remaining wash buffer. Then, 5 μ L of conjugate was added to the TA wells and 200 μ L p-nitrophenyl phosphate substrate solution (200 μ L) was added to each well, which was followed by incubation for 1 h without shaking. Finally, 50 μ L of stop solution (trisodium phosphate in water) was added to each well. Immediately after the addition of the stop solution, the optical density was measured spectrophotometrically at 405 nm using a microtiter plate reader [35].

Cortisol was measured using a cortisol ELISA kit (DRG International Inc., Springfield, NJ, USA), that has been validated in horses [45,46]. The ELISA was performed as described by Bennett-Wimbush et al. (2020). During the first incubation, sample cortisol competed with cortisol conjugated to horseradish peroxidase for binding to the specific sites of the cortisol antiserum-coated wells. Following incubation all unbound material was removed by aspiration and washing. The substrate solution of tetramethylbenzidine was added, incubated for 15 min and the reaction was stopped by adding 0.5 M sulfuric acid. The optical density was read spectrophotometrically at 450 nm using a microtiter plate reader [45].

2.6. Establishing Reference Values

For establishing reference values, in total 74 horses were used. They consisted of 48 horses that were chosen randomly, the 10 horses of the control group and the values t_0 (taken before stressing the horses in the stable facilities) of the 16 horses subjected to the different stress levels as they were taken under similar conditions.

2.7. Statistical Analysis

The normality of data and model residuals were tested with the Shapiro–Wilk normality test. The heteroskedasticity of model residuals was tested via the Breusch–Pagan test. The homogeneity of variances among groups was tested with Bartlett’s test. Following assumptions checks, the comparison between the four stress levels in the study group and most of the stress parameters was then performed using median-based quantile regressions, as most of the data contained contaminations, e.g., was not distributed normally. The evaluation of the ridden horse ethogram score and the different stress levels was performed using a classical linear regression, as all assumptions were satisfied. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Model results are presented as medians or means with 95% confidence intervals. All analyses were conducted using R Statistical software (R version 4.0.3, 2020; RStudio desktop version 1.4.1103, 2021).

3. Results

3.1. Establishing Reference Values of Substance P

When looking at the 4 SP values (t_0 of four different days) of the 16 horses in the experimental group, the horses did not show large intraindividual variations (SD lower than mean value in all horses; Table 1). Conversely, there were very large interindividual variations in SP plasma concentrations when t_0 samples of all horses (experimental, control, reference group) were considered, displayed by the large SD (mean 2472 pg/mL, SD 1643 pg/mL; Table 2). Two horses of the reference group showed extremely high SP values (31,337 pg/mL and 23,247 pg/mL). As these 2 horses were 3- and 4-year-old mares which were brought to a different stable the same morning, the values were not considered. Tables 1 and 2 show mean and median values as well as the standard deviations (SD) and interquartile ranges (IQR) of the SP plasma concentrations in pg/mL.

As a result, the reference range obtained in all examined horses in this study reached from 643 pg/mL to 8019 pg/mL with large variations between individual horses.

When looking at the difference between the sexes, male individuals showed mean SP plasma concentrations of 2303 ± 1449 pg/mL, while the values of mares were 2533 ± 1706 pg/mL. Although some studies pointed out gender differences in SP in humans [47] or sex differences of the SP content of certain brain areas in rats [48], no clear conclusions regarding a gender difference in horses could be drawn in this study due to a relatively small number of samples. The gender distribution was far from even and with a share of only 36%, male horses were clearly underrepresented. As a result, no further conclusions on gender differences in SP plasma concentrations in horses could be drawn, which would require further investigation and studies.

Table 1. SP plasma concentrations in pg/mL of the 16 horses of the experimental group at t0 of 4 different days. Individual mean and median values are shown as well as the intraindividual standard deviation (SD) and interquartile range (IQR).

Horse No.	Mean	SD	IQR	Median
1 (n = 4)	2492.1	513.4	776.5	2533.4
2 (n = 4)	2712.6	432.9	571.9	2812.1
3 (n = 4)	1232.1	550.6	774.5	1177.2
4 (n = 4)	1138.9	173.9	238.2	1103.5
5 (n = 4)	1269.7	123.7	137.3	1232.2
6 (n = 4)	2263.7	81.0	96.8	2279.3
7 (n = 4)	1046.8	86.6	101.9	1062.2
8 (n = 4)	843.8	74.5	95.9	852.1
9 (n = 4)	4786.4	470.1	620.1	4722.5
10 (n = 4)	1942.5	367.0	427.6	1948.4
11 (n = 4)	2378.9	588.2	630.6	2178.3
12 (n = 4)	1398.4	158.3	171.5	1416.8
13 (n = 4)	6132.6	1920.4	1235.7	6528.9
14 (n = 4)	4409.5	1860.0	2403.1	3973.8
15 (n = 4)	1990.6	484.7	456.0	2101.4
16 (n = 4)	4817.9	964.6	1408.9	4671.5

Table 2. Mean SP plasma concentrations in pg/mL at t0 of all horses used in this study (experimental group (n = 16), control group (n = 10), reference group (n = 46)).

	Mean	SD	IQR	Median
(n = 72)	2472	1643	1764	2007

3.2. Four Different Stress Levels—Correlation with Stress Parameters

3.2.1. Cortisol

Cortisol showed a linear increase according to the 4 stress levels with serum cortisol concentrations reaching from 56.4 ng/mL to 150.4 ng/mL when t2 values (after the horse had been stressed) were compared. The lowest overall cortisol concentrations were measured in horses at stress level 1, whereas stress level 4 displayed the highest concentrations. While the increase in cortisol was not significant in horses ridden without an endoscope (stress level 1 and 2; $p = 0.875$), there was a significant increase between horses ridden without an endoscope and those ridden with an inserted endoscope (stress level 2 and 3; $p = 0.039$). Furthermore, comparing stress level 1 with stress level 4, as well as stress level 2 and 4 showed a significant increase in cortisol concentrations ($p = 0.043$ and $p = 0.020$, respectively) (Figure 2). Within the two levels of the horses ridden with an inserted endoscope there was no significant increase (stress levels 3 and 4, $p = 0.656$).

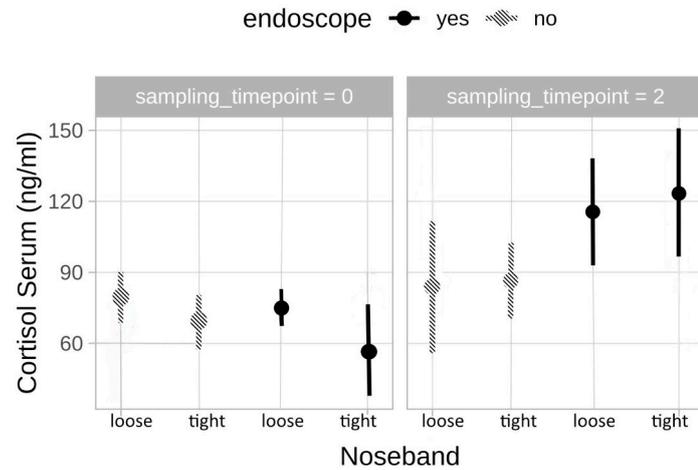


Figure 2. Cortisol in correlation with the different stress levels (level 1 = loose noseband, no endoscope, level 2 = tight noseband, no endoscope, level 3 = loose noseband plus endoscope, level 4 = tight noseband plus endoscope) at timepoint 0 (t0) and 2 (t2) after riding (n = 16). There was a significant increase between stress level 2 and 3 ($p = 0.039$), stress level 1 and 4 ($p = 0.043$) and as stress level 2 and 4 ($p = 0.020$).

3.2.2. Substance P

There was no significant correlation between SP plasma concentrations and the four different stress levels. SP concentrations did not allow any conclusions to be drawn with regards to the strength of the different stress levels, and no trend could be identified. Neither was there a statistically significant difference when focusing on the acute stress reaction (difference t0/t1) after the noseband was tightened or the overground endoscope was inserted (level 1: $p = 0.923$, level 2: $p = 0.592$, level 3: $p = 0.912$, level 4: $p = 0.873$, respectively), nor was there any significant difference between t0 and t2 (after riding) for any of the stress levels (level 1: $p = 0.670$, level 2: $p = 0.950$, level 3: $p = 0.748$, level 4: $p = 0.924$, respectively) (Figure 3).

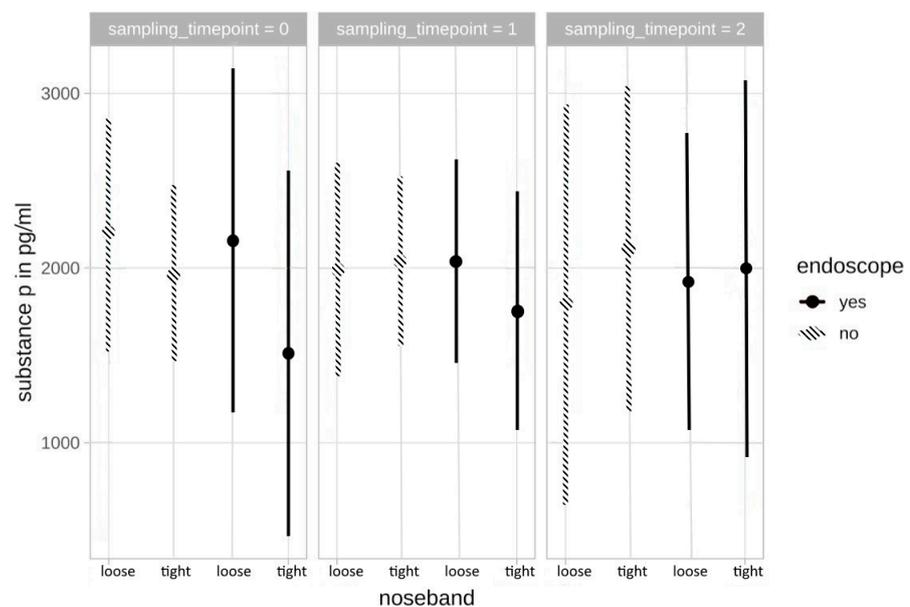


Figure 3. SP plasma concentrations in correlation with the different stress levels at t0–t2.

3.3. Ridden Horse Ethogram (RHE)

When comparing the RHE scores between the different stress levels, a significant difference ($p = 0.0003$) was found between the horses ridden with loose and tight noseband regardless of whether the endoscope was inserted or not (Figure 4).

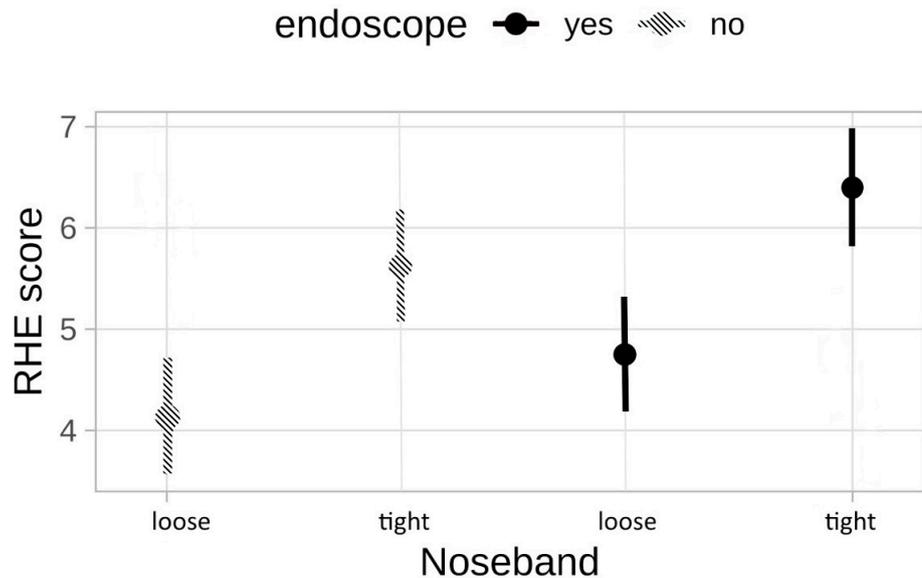


Figure 4. Parameters of the Ridden Horse Ethogram (RHE) shown by the horses ridden with loose or tight nosebands and with and without an inserted endoscope. There was a significant increase in the displayed stress behavior in horses ridden with tight nosebands regardless of the inserted endoscope ($p = 0.0003$).

While the group with the loose noseband mainly showed behavioral changes such as head tilt, head in front of vertical or mouth opening (RHE number 2, 3, 10), the horses which were not able to open their mouths showed much more backwards rotated ears, exposed sclera, or intense stare (RHE parameters 6, 8, 9) (Table 3). The frequency of every displayed parameter in the separate groups is shown in Figure 5. Display of many RHE stress parameters also correlated with the riders’ impression that the horses were more dissatisfied with the tight noseband independently from the endoscope.

Table 3. RHE behavior (1–10) shown by the horses in the different settings (n = 16), regardless of the frequency of the behavioral changes in the respective group.

RHE Score	RHE Description	Loose Noseband, No Endoscope	Tight Noseband, No Endoscope	Loose Noseband Plus Endoscope	Tight Noseband Plus Endoscope
1	Repeated changes of head position (up/down).	38% (6/16)	50% (8/16)	44% (7/16)	88% (14/16)
2	Head tilted/tilting repeatedly	44% (7/16)	44% (7/16)	50% (8/16)	63% (10/16)
3	Head in front of vertical (>30°) for >10 s	31% (5/16)	44% (7/16)	44% (7/16)	75% (12/16)
4	Head behind vertical (>10°) for >10 s	50% (8/16)	56% (9/16)	44% (7/16)	56% (9/16)
5	Head position changes regularly, tossed or twisted.	6% (1/16)	6% (1/16)	6% (1/16)	6% (1/16)

Table 3. Cont.

RHE Score	RHE Description	Loose Noseband, No Endoscope	Tight Noseband, No Endoscope	Loose Noseband Plus Endoscope	Tight Noseband Plus Endoscope
6	Ears rotated back behind vertical or flat >5 s.	19% (3/16)	38% (6/16)	13% (2/16)	31% (5/16)
7	Eyelids closed or half closed for 2–5 s.	0% (0/16)	0% (0/16)	0% (0/16)	6% (1/16)
8	Sclera exposed repeatedly	75% (12/16)	81% (13/16)	69% (11/16)	88% (14/16)
9	Intense stare for >5 s	50% (8/16)	81% (13/16)	44% (7/16)	75% (12/16)
10	Mouth opening, shutting repeatedly for >10 s	69% (11/16)	38% (6/16)	69% (11/16)	50% (8/16)

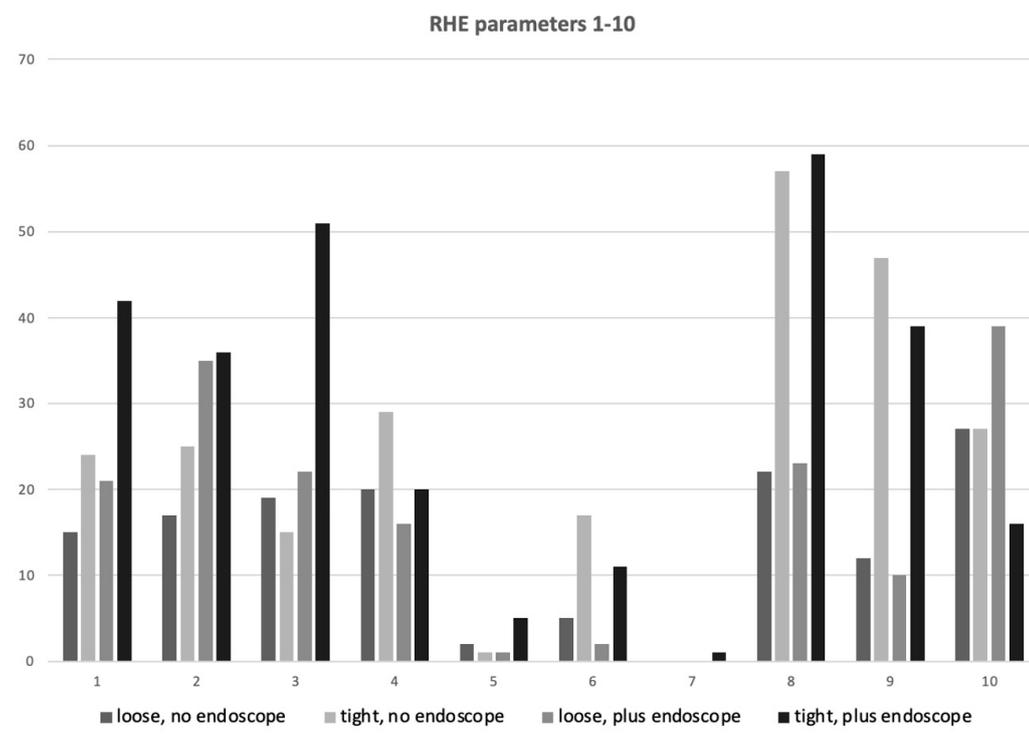


Figure 5. Frequency of individual RHE parameters 1–10 shown by the horses of each group (n = 16).

The RHE scores correlated neither with the cortisol concentrations (level 1: $p = 0.967$, level 2: $p = 0.419$, level 3: $p = 0.990$, level 4: $p = 0.268$), nor with the SP levels (level 1: $p = 0.929$, level 2: $p = 0.353$, level 3: $p = 0.456$, level 4: $p = 0.625$).

3.4. Correlation between Stress Parameters and Ridden Horse Ethogram (RHE)

3.4.1. Cortisol

There was no correlation between serum cortisol concentrations and the ridden horse ethogram score when the number of parameters displayed by the horses were considered (see Section 3.3). High cortisol concentrations did not match with the highest RHE scores, and the same applies to low serum cortisol concentrations and the lowest RHE scores.

3.4.2. Substance P

SP showed, just like cortisol, no correlation between the number of parameters of the RHE score displayed by the horses and changes in the plasma concentration of SP (see

Section 3.3). No statistically significant correlation between high or low SP concentrations and the level of the RHE score could be pointed out.

4. Discussion

Because equestrian sport has increasingly come under public criticism in recent years due to its training methods, there has also been a call for parameters that make stress conditions in horses objectifiable. In this study, the usability of substance P (SP) as a stress parameter in horses was evaluated. To determine whether SP increases with stress, a four-level stressor model was used. To classify the results, SP values were compared to established stress parameters such as cortisol. For focusing on SP as a potential marker of emotional stress in horses, an RHE and the riders' impression when riding the horses were also considered.

The present study shows that plasma concentrations of SP can regularly and reliably be measured in horses. The results for establishing reference values revealed, as seen in ruminants, a wide range of SP concentrations among individuals (see Table 1). The problem of the heterogenous results of research work and different SP concentrations among the studies has therefore been addressed in a review article [32]. According to this review, the main reasons for heterogenous outcomes concerning SP concentrations were too inconsistent study designs, cohorts and procedures [32]. Most of the studies had no control group and a lack of studies aiming for reference values in adult, healthy cattle and calves has been pointed out [32]. SP concentrations in horses and ruminants seem to be on similar levels and comparable in their heterogenous distribution width. In ruminants though, concentration values seem to differ more among different studies and study designs than within one study. In contrast, the SP plasma concentrations of horses within this study differed significantly, even when the same study protocol was used. This finding indicates even higher SP plasma concentration ranges in horses than in cattle. Apart from that, SP in individual horses shows a significantly smaller variation than in the whole cohort. This finding in the small study group evaluated in this study could indicate that SP may be a more individual parameter in horses, where changes in the SP concentration in individuals are more representative than comparing them to different horses. On the other hand, this may complicate an establishment of general reference values and should be evaluated again using a larger cohort of horses.

The stress model utilized in this study consisted of the use of a loose versus tight noseband and the additional application of an overground endoscope as it is regularly used to examine the upper airways in horses. Several studies have already shown a link between tight nosebands and the triggering of stress in horses [4,6], whereas the stress effect of applying an overground endoscope has not been looked at further in this context. Nonetheless, administering an endoscope through the nasal cavity in non-sedated horses can be assumed as a considerable stressor, not only represented by regular defensive behaviors. Additionally, riding with the administered overground endoscope is likely to cause stress and discomfort in the horses, attributed by the foreign body irritation in the nose and the pharynx. The results of this study show a linear increase in cortisol correlating with the different stress levels (lowest serum cortisol concentrations in level 1 and the highest concentrations in level 4 with significant increases between level 1 to 4, 2 to 3 and 2 to 4), which proves the triggering of a stress response and points out the suitability of the used four-level stress model. In studies where horses were exposed to very low levels of stress (lunging) no cortisol response was triggered [49].

In human medicine, the relationship between cortisol and emotional stress has been examined and differences in response to psychological stress were associated with differences in certain personality traits [50]. Although cortisol reliably rose with the stress levels, the SP concentrations, on the other hand, showed no significant correlation with the intensity of the four different stress levels. A possible reason for SP not matching with the stress model and cortisol concentrations might be due to the lack of effective or strong enough stressors used in this study [21]. In ruminants SP concentrations have mainly been investigated in

more painful diseases and procedures than the minor stressors used in our model [34,35]. Although the horses were stressed, looking at the studies in ruminants, it could be stated that a much stronger stressor or a painful stimulus is needed for significant increases in SP concentrations. Hence, further investigation on SP concentrations in different stress models or diseased horses with painful conditions, for example with severe lameness or colic is needed. There have also been varying results in ruminants on the correlation between cortisol and SP. Because SP is considered a reliable parameter in cattle, electroejaculation was considered non-painful in one study since concentrations of SP remained low despite increasing cortisol levels [51].

In humans the effect of acute psychological stress on beta-endorphin and SP plasma concentrations was investigated in one study [52]. Whereas SP levels seemed to be unaffected by parachuting, beta-endorphin concentrations increased immediately after jumping [52]. A remarkable finding in this study was that high-anxiety persons showed higher total SP levels, while low-anxiety jumpers displayed lower total concentration. This fact could also be the reason for the given interindividual difference in horses and would be very interesting to investigate in a larger study population with the horses' individual stress level considered.

The RHE was used to evaluate and quantify the horses' stress behavior under saddle. Other studies have shown that horses ridden with a very tight noseband have limited facial signs of stress [53]. In our study, it became clear that the horses in the tight noseband groups resorted to other stress-related behavioral issues than the horses that were able to open their mouths and express their discomfort as a response to riders' actions. The tight noseband horses predominantly showed behavioral changes which are regarded as so-called "learned helplessness". This is an interesting fact and proved that the RHE might not only be suitable to help detect painful conditions in horses but also emotionally stressful situations. One limitation of the present study was the fact that the scoring system (RHE) only considered whether the different parameters were shown by the individual horse, but not how often or for how long the individual parameters were displayed. Some horses showed single parameters only briefly, while other horses showed them permanently or repeatedly, especially when ridden with tight nosebands. This fact is not reflected in the ridden horse ethogram used here. A recent review on the RHE looked at the fact that there is a risk when using the RHE as a standalone technique as there are many more aspects that may contribute to suboptimal welfare in the ridden horse. Another flaw is the equal weighting of the parameters without an evidence-base for that [43]. In this study, the results clearly showed the reliability in visible stress and coping mechanisms when horses were subjected to stressors such as tight nosebands or an overground endoscope. While still being a subjective tool relying on the expertise of the examiner, using the RHE in ridden horses may help to identify unfair training methods in equine sports.

Another limitation of the study could be that SP was measured from the plasma instead of, as in many other studies, from the brain tissue itself [18,21,37]. For example, release of SP was sensitive to emotional stressors in distinct regions of the amygdala, which is known to be a key area in processing of emotions, or the peri-aqueductal grey in rats [21,54]. One study in humans even evaluated SP levels in psoriatic and non-psoriatic skin and found an increased number of SP- and NK-1R-positive inflammatory cells in noninvolved psoriatic skin as a response to chronic stress [55]. Nevertheless, as studies in humans and ruminants have clearly shown a measurable increase in SP concentration, plasma was chosen to test the utility of the parameter in live horses in the context of a ridden horse's stress detection and evaluation.

As already described above, one reason for the insufficient increase in SP concentration could be that SP rises with pain rather than stress, which causes discomfort but does not cause physical soreness. Another possible explanation for the lack of significant increase in SP levels might be the fact that most of the horses used in this study were very experienced riding lesson horses, that are used to various stressors such as a great number of consistently changing and/or unexperienced riders. Furthermore, it is not known whether these horses

might be used to strictly tightened nosebands because there was no consistent evidence on how they were ridden throughout their riding lessons. So, habituation effects to moderate stressors during these riding lessons may also have resulted in coping, which may have led to ineffectively stressful conditions for significant SP value rises. Addressing that, a comparison with young, inexperienced horses in the same stress model may provide further information on the effectiveness of the performed stress model for SP as a biomarker for stress in horses.

5. Conclusions

As a conclusion, SP levels were not suitable to quantify emotional stress in our four-level minor stress model. Since cortisol increased analogously to the stress level, but SP did not, it makes the use of SP as a stress parameter in this context at least questionable. Further studies are needed to gain more information on SP levels depending on the stress level of the individual horse, and to evaluate the parameter in horses which are exposed to greater stress or painful conditions (e.g., colic).

Author Contributions: Conceptualization, A.M. and D.S.; methodology, A.M.; validation: A.M. and D.S.; formal analysis, A.M. and D.S.; investigation, D.S. and A.M.; resources, A.M. and D.S.; data curation, Y.Z., A.M. and D.S.; writing—original draft preparation, D.S. and A.M., writing—review and editing, A.M.; visualization, A.M. and D.S.; supervision, A.M.; project administration, A.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the government of Bavaria (Oberbayern), Munich, Germany (approval AZ ROB-55.2-2532.Vet_02-21-100, February 2022).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from the owners of the horses (Bavaria's Main State Stud Farm Schwaiganger).

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors would like to thank Frank Weber and Sandra Kirsch for laboratory work and the riders and helping hands at the Main State Stud Farm for making this experiment possible.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Heuschmann, G. Tug of War: Classical Versus 'Modern' Dressage. In *Why Classic Training Works and How Incorrect 'Modern' Riding Negatively Affects Horses' Health*; Trafalgar Square Books: North Pomfret, VT, USA, 2018; p. 144.
2. Weller, D.; Franklin, S.; Shea, G.; White, P.; Fenner, K.; Wilson, B.; Wilkins, C.; McGreevy, P. The Reported Use of Nosebands in Racing and Equestrian Pursuits. *Animals* **2020**, *10*, 776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Pérez-Manrique, L.; León-Pérez, K.; Zamora-Sánchez, E.; Davies, S.; Ober, C.; Wilson, B.; McGreevy, P. Prevalence and Distribution of Lesions in the Nasal Bones and Mandibles of a Sample of 144 Riding Horses. *Animals* **2020**, *10*, 1661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Doherty, O.; Casey, V.; McGreevy, P.; Arkins, S. Noseband Use in Equestrian Sports—An International Study. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0169060. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Merckies, K.; Copelin, C.; Small, N.; Young, J. Noseband Fit: Measurements and Perceptions of Canadian Equestrians. *Animals* **2022**, *12*, 2685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Fenner, K.; Yoon, S.; White, P.; Starling, M.; McGreevy, P. The Effect of Noseband Tightening on Horses' Behavior, Eye Temperature, and Cardiac Responses. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0154179. [[CrossRef](#)]
7. Uldahl, M.; Clayton, H.M. Lesions associated with the use of bits, nosebands, spurs and whips in Danish competition horses. *Equine Veter. J.* **2018**, *51*, 154–162. [[CrossRef](#)]
8. Duke, D. The Effects of a Variation in Noseband Tightness on the Rein Tension of the Ridden Horse. Ph.D. Thesis, University of Plymouth, Plymouth, UK, 2017.
9. McGreevy, P.; Warren-Smith, A.; Guisard, Y. The effect of double bridles and jaw-clamping crank nosebands on temperature of eyes and facial skin of horses. *J. Veter. Behav.* **2012**, *7*, 142–148. [[CrossRef](#)]
10. Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.S.; Blok, M.B.; Begeman, L.; Kamphuis, M.C.D.; Lameris, M.C.; Spierenburg, A.J.; Lashley, M.J.J.O. Workload and stress in horses: Comparison in horses ridden deep and round ('rollkur') with a draw rein and horses ridden in a natural frame with only light rein contact. *Tijdschr Diergeneesk* **2006**, *131*, 152–157. [[PubMed](#)]

11. McGreevy, P.D. The advent of equitation science. *Veter. J.* **2007**, *174*, 492–500. [[CrossRef](#)]
12. McGreevy, P. The fine line between pressure and pain: Ask the horse. *Veter. J.* **2011**, *188*, 250–251. [[CrossRef](#)]
13. Heleski, C.; McGreevy, P.; Kaiser, L.; Lavagnino, M.; Tans, E.; Bello, N.; Clayton, H. Effects on behaviour and rein tension on horses ridden with or without martingales and rein inserts. *Veter. J.* **2009**, *181*, 56–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Dyson, S.; Berger, J.; Ellis, A.D.; Mullard, J. Development of an ethogram for a pain scoring system in ridden horses and its application to determine the presence of musculoskeletal pain. *J. Veter. Behav.* **2018**, *23*, 47–57. [[CrossRef](#)]
15. Dyson, S.; Ellis, A. Application of a Ridden Horse Pain Ethogram to horses competing at 5-star three-day-events: Comparison with performance. *Equine Vet. Educ.* **2022**, *34*, 306–315. [[CrossRef](#)]
16. Hellhammer, D.H.; Wüst, S.; Kudielka, B.M. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology* **2009**, *34*, 163–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Campbell, J.; Ehler, U. Acute psychosocial stress: Does the emotional stress response correspond with physiological responses? *Psychoneuroendocrinology* **2012**, *37*, 1111–1134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Ebner, K.; Singewald, N. The role of substance P in stress and anxiety responses. *Amino Acids* **2006**, *31*, 251–272. [[CrossRef](#)]
19. Nieber, K.; Oehme, P. Substance P—A neuropeptide transmitter. *Z. Gesamte Inn. Med.* **1982**, *37*, 577–582.
20. McLean, S.; Ganong, A.H.; Seeger, T.F.; Bryce, D.K.; Pratt, K.G.; Reynolds, L.S.; Siok, C.J.; Lowe, J.A.; Heym, J. Activity and Distribution of Binding Sites in Brain of a Nonpeptide Substance P (NK₁) Receptor Antagonist. *Science* **1991**, *251*, 437–439. [[CrossRef](#)]
21. Ebner, K.; Rupniak, N.M.; Saria, A.; Singewald, N. Substance P in the medial amygdala: Emotional stress-sensitive release and modulation of anxiety-related behavior in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 4280–4285. [[CrossRef](#)]
22. Herbert, M.K.; Holzer, P. Why are substance P(NK1)-receptor antagonists ineffective in pain treatment? *Anaesthetist* **2002**, *51*, 308–319. [[CrossRef](#)]
23. Suvas, S. Role of Substance P Neuropeptide in Inflammation, Wound Healing, and Tissue Homeostasis. *J. Immunol.* **2017**, *199*, 1543–1552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ebner, K.; Muigg, P.; Singewald, G.; Singewald, N. Substance P in stress and anxiety: NK-1 receptor antagonism interacts with key brain areas of the stress circuitry. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1144*, 61–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Oehme, P.; Hecht, K.; Faulhaber, H.D.; Roske, I.; Rathack, R. Relationship of substance P to catecholamines, stress, and hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1987**, *10* (Suppl. 12), S109–S111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Iftikhar, K.; Siddiq, A.; Baig, S.G.; Zehra, S. Substance P: A neuropeptide involved in the psychopathology of anxiety disorders. *Neuropeptides* **2019**, *79*, 101993. [[CrossRef](#)]
27. Jessop, D.S.; Renshaw, D.; Larsen, P.J.; Chowdrey, H.S.; Harbuz, M.S. Substance P Is Involved in Terminating the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Response to Acute Stress Through Centrally Located Neurokinin-1 Receptors. *Stress* **2000**, *3*, 209–220. [[CrossRef](#)]
28. Mashaghi, A.; Marmalidou, A.; Tehrani, M.; Grace, P.M.; Pothoulakis, C.; Dana, R. Neuropeptide Substance P and the Immune Response. *Cell Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 4249–4264. [[CrossRef](#)]
29. Rosenkranz, M.A. Substance P at the nexus of mind and body in chronic inflammation and affective disorders. *Psychol. Bull.* **2007**, *133*, 1007–1037. [[CrossRef](#)]
30. Redkiewicz, P. The Regenerative Potential of Substance, P. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 750. [[CrossRef](#)]
31. Feickert, M.; Burckhardt, B.B. Substance P in cardiovascular diseases—A bioanalytical review. *Clin. Chim. Acta* **2019**, *495*, 501–506. [[CrossRef](#)]
32. Tschoner, T.; Feist, M. Substance P concentrations in the blood plasma and serum of adult cattle and calves during different painful procedures and conditions—A systematic review. *BMC Veter. Res.* **2022**, *18*, 232. [[CrossRef](#)]
33. Barragan, A.A.; Piñeiro, J.M.; Schuenemann, G.M.; Rajala-Schultz, P.J.; Sanders, D.E.; Lakritz, J.; Bas, S. Assessment of daily activity patterns and biomarkers of pain, inflammation, and stress in lactating dairy cows diagnosed with clinical metritis. *J. Dairy Sci.* **2018**, *101*, 8248–8258. [[CrossRef](#)]
34. Bustamante, H.A.; Rodríguez, A.R.; Herzberg, D.E.; Werner, M.P. Stress and pain response after oligofructose induced-lameness in dairy heifers. *J. Veter. Sci.* **2015**, *16*, 405–411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Coetzee, J.F.; Lubbers, B.V.; Toerber, S.E.; Gehring, R.; Thomson, D.U.; White, B.J.; Apley, M.D. Plasma concentrations of substance P and cortisol in beef calves after castration or simulated castration. *Am. J. Veter. Res.* **2008**, *69*, 751–762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Gregg, T.R.; Siegel, A. Brain structures and neurotransmitters regulating aggression in cats: Implications for human aggression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2001**, *25*, 91–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Aguiar, M.S.; Brandão, M.L. Effects of microinjections of the neuropeptide substance P in the dorsal periaqueductal gray on the behaviour of rats in the plus-maze test. *Physiol. Behav.* **1996**, *60*, 1183–1186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Malone, E.D.; Kannan, M.S.; Brown, D.R. Evaluation of substance P as a neurotransmitter in equine jejunum. *Am. J. Veter. Res.* **2000**, *61*, 1178–1184. [[CrossRef](#)]
39. Caron, J.P.; Bowker, R.M.; Abhold, R.H.; Toppin, D.S.; Sonea, I.M.; Vex, K.B. Substance P in the synovial membrane and fluid of the equine middle carpal joint. *Equine Veter. J.* **1992**, *24*, 364–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Kirker-Head, C.A.; Chandna, V.K.; Agarwal, R.K.; Morris, E.A.; Tidwell, A.; O’Callaghan, M.W.; Rand, W.; Kumar, M.S.A. Concentrations of substance P and prostaglandin E2 in synovial fluid of normal and abnormal joints of horses. *Am. J. Veter. Res.* **2000**, *61*, 714–718. [[CrossRef](#)]

41. Everett, J.B.; Schumacher, J.; Doherty, T.J.; Black, R.A.; Amelse, L.L.; Krawczel, P.; Coetzee, J.F.; Whitlock, B.K.; Krawczel, P. Effects of stacked wedge pads and chains applied to the forefeet of Tennessee Walking Horses for a five-day period on behavioral and biochemical indicators of pain, stress, and inflammation. *Am. J. Veter. Res.* **2018**, *79*, 21–32. [[CrossRef](#)]
42. Davison, J.; Lumsden, J.; Boston, R.; Ahern, B. Overground endoscopy in 311 Thoroughbred racehorses: Findings and correlation to resting laryngeal function. *Aust. Veter. J.* **2017**, *95*, 338–342. [[CrossRef](#)]
43. Ladewig, J.; McLean, A.N.; Wilkins, C.L.; Fenner, K.; Christensen, J.W.; McGreevy, P.D. A review of The Ridden Horse pain Ethogram and its potential to improve ridden horse welfare. *J. Vet. Behav.* **2022**, *54*, 54–61. [[CrossRef](#)]
44. Mosher, R.A.; Coetzee, J.F.; Allen, P.S.; Havel, J.A.; Griffith, G.R.; Wang, C. Effects of sample handling methods on substance P concentrations and immunoreactivity in bovine blood samples. *Am. J. Veter. Res.* **2014**, *75*, 109–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Bennett-Wimbush, K.; Suagee-Bedore, J.; Amstutz, M.; Duthie, M. Effects of Overcheck Use on Stress Parameters and Welfare Implications in Driving Horses. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* **2019**, *23*, 83–94. [[CrossRef](#)]
46. Kędzierski, W.; Cywińska, A.; Strzelec, K.; Kowalik, S. Changes in salivary and plasma cortisol levels in Purebred Arabian horses during race training session. *Anim. Sci. J.* **2013**, *85*, 313–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Eugene, A.R. A Model-Based Meta-Analysis Evaluating Gender Differences on Blood Flow Responses to Brachial Artery Infusions of Acetylcholine, Albuterol, ATP, Bradykinin, Estradiol, Glyceryl Trinitrate, L-NMMA, Nevibolol, Norepinephrine, Sodium Nitroprusside, Substance, P, and Verapamil. *MEDtube Sci.* **2016**, *4*, 16–28.
48. Pittenger, S.T.; Swalve, N.; Chou, S.; Smith, M.D.; Hoonakker, A.J.; Pudiak, C.M.; Fleckenstein, A.E.; Hanson, G.R.; Bevins, R.A. Sex differences in neurotensin and substance P following nicotine self-administration in rats. *Synapse* **2016**, *70*, 336–346. [[CrossRef](#)]
49. Janzekovic, M.; Prisenk, J.; Katalinic, B. Assessment of Stress on Horses through the Salivary Cortisol Concentration. *DAAAM Int. Sci. Book* **2017**, *16*, 55–62. [[CrossRef](#)]
50. Oswald, L.M.; Zandi, P.; Nestadt, G.; Potash, J.B.; Kalaydjian, A.E.; Wand, G.S. Relationship between Cortisol Responses to Stress and Personality. *Neuropsychopharmacology* **2006**, *31*, 1583–1591. [[CrossRef](#)]
51. Whitlock, B.; Coffman, E.; Coetzee, J.; Daniel, J. Electroejaculation increased vocalization and plasma concentrations of cortisol and progesterone, but not substance P, in beef bulls. *Theriogenology* **2012**, *78*, 737–746. [[CrossRef](#)]
52. Schedlowski, M.; Fluge, T.; Richter, S.; Tewes, U.; Schmidt, R.E.; Wagner, T.O. Beta-endorphin, but not substance-P, is increased by acute stress in humans. *Psychoneuroendocrinology* **1995**, *20*, 103–110. [[CrossRef](#)]
53. Dyson, S.; Pollard, D. Application of a Ridden Horse Pain Ethogram and Its Relationship with Gait in a Convenience Sample of 60 Riding Horses. *Animals* **2020**, *10*, 1044. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Rosén, A.; Brodin, K.; Eneroth, P.; Brodin, E. Short-term restraint stress and s.c. saline injection alter the tissue levels of substance P and cholecystokinin in the peri-aqueductal grey and limbic regions of rat brain. *Acta Physiol. Scand.* **1992**, *146*, 341–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Remröd, C.; Lonne-Rahm, S.; Nordlind, K. Study of substance P and its receptor neurokinin-1 in psoriasis and their relation to chronic stress and pruritus. *Arch. Dermatol. Res.* **2007**, *299*, 85–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

IV. ERWEITERTE DISKUSSION

Da der Pferdesport in den letzten Jahren aufgrund verschiedener strittiger Trainingsmethoden immer mehr in die öffentliche Kritik geraten ist, gab es zunehmend auch Bestrebungen, Parameter zu ermitteln, um Stress bei Pferden objektivierbar machen zu können. In diesem Zusammenhang wurde das Ridden Horse Ethogram (RHE) entwickelt, das darauf abzielt, Stress- und Schmerzzustände bei gerittenen Pferden anhand ihres Verhaltens und ihrer Körpersprache zu bewerten (Dyson, Berger et al. 2018, Dyson und Ellis 2022). Mehrere Studien untersuchten auch die Zusammenhänge zwischen verschiedenen Trainingsmethoden, Kopfpositionen, eng verschnallten Nasenriemen, sowie des Einsatzes von Hilfszügeln mit Stress- und Angstverhalten bei Pferden durch Messung von Cortisol, Augen- und Hauttemperatur, sowie der Herzfrequenzvariabilität (Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, Blok et al. 2006, McGreevy 2007, Heleski, McGreevy et al. 2009, McGreevy 2011, McGreevy, Warren-Smith et al. 2012, Fenner, Yoon et al. 2016, Doherty, Casey et al. 2017, Duke 2017). Im Rahmen der durchgeführten Studie wurde vordergründig die Eignung von Substanz P als Stressparameter bei Pferden evaluiert. Um zu bestimmen, ob Substanz P bei Stress zunimmt, wurde ein vierstufiges Stressmodell verwendet und zur Einordnung der Ergebnisse wurden die ermittelten Substanz-P-Werte mit etablierten Stressparametern wie Cortisol verglichen.

Zunächst wurde auch Alpha-Amylase als potenzieller Stressparameter in Erwägung gezogen. Da zahlreiche Studien die Zuverlässigkeit der Bestimmung im Speichel bestätigt hatten (Contreras-Aguilar, Henry et al. 2019, Contreras-Aguilar, Martinez-Subiela et al. 2019, Contreras-Aguilar, Ceron et al. 2021, Kimura, Borankulova et al. 2023), führten wir dazu umfangreiche Voruntersuchungen durch. Im Gegensatz zu den beschriebenen Studien erwiesen sich die im Rahmen der Voruntersuchungen gemessenen Speichelaktivitäten jedoch als sehr stark schwankend und unbeständig. Aus diesem Grund wurde auf die weitere Bestimmung aus dem Speichel in der Studie verzichtet und stattdessen Aktivitätswerte im Serum gemessen, da beim Menschen auch die Eignung von Serum-Alpha-Amylase als Stressmarker beschrieben ist (Mandal, Bhattacharjee et al. 2019). Auch die Serumwerte zeigten sich jedoch größtenteils unterhalb des validierten Messbereichs und ohne Zusammenhang mit dem Stressmodell, weshalb

die Messung, sowie die Relevanz dieses Parameters als Stressindikator nicht weiter verfolgt wurde.

Die Wahl von Substanz P als potenziellem Stressparameter liegt darin begründet, dass es einen Zusammenhang mit emotionalem Stress bei Menschen und Tieren zu geben scheint. Substanz P wurde mit einer Reihe pathophysiologischer Vorgänge in Verbindung gebracht, einschließlich der Stressregulation, sowie affektiver und angstbezogener Verhaltensweisen (Ebner und Singewald 2006). Substanz P und sein bevorzugter Neurokinin-1-Rezeptor (NK1-Rezeptor) wurden vornehmlich in Gehirnarealen nachgewiesen, welche bekanntermaßen an Stress- und Angstreaktionen beteiligt sind. Als Folge der Exposition gegenüber Stressreizen wurde dabei wiederholt eine Veränderung des Gehalts an Substanz P im Gehirngewebe nachgewiesen. In der Humanmedizin konnte dabei gezeigt werden, dass Substanz P besonders bei emotionalem Stress zunimmt und diese Wirkung mit der Intensität des Stressors zusammenhängt (Ebner und Singewald 2006). Diese Reaktion wurde auch bei Ratten untersucht und ergab ähnliche Ergebnisse (Ebner, Rupniak et al. 2004). Aufgrund deren Rolle bei Stress- und Angstmodulation wurden Substanz P und dessen Rezeptor auch bereits bei der Behandlung von Angststörungen und Depressionen diskutiert (Ebner, Rupniak et al. 2004). Substanz P scheint eine Anti-Stress-Wirkung auszuüben, indem es sowohl die Biosynthese als auch die Freisetzung von Katecholaminen in den Nebennieren moduliert, was wiederum das Stoffwechselgleichgewicht im Katecholaminsystem aufrechterhält (Oehme, Hecht et al. 1987). Darüber hinaus sind Substanz P und Cortisol bei der Stressantwort eng verknüpft, da die Freisetzung von Substanz P als Reaktion auf einen Stressor die HHN aktiviert, was wiederum über angstausslösende Effekte die Freisetzung von Cortisol aus den Nebennieren fördert (Iftikhar, Siddiq et al. 2020). Andere Studien zeigen, dass Substanz P zwar nicht die anfängliche Höhe der Stressantwort der HHN hemmt, jedoch deren Effekt über Neurokinin-1-Rezeptoren auf zentraler Ebene verbessern kann, um die Dauer der Stressreaktion zu verkürzen. Dies könnte bei der Kontrolle des Übergangs von akutem zu chronischem Stress von Bedeutung sein (Jessop, Renshaw et al. 2000). In der Tiermedizin wurde Substanz P als Biomarker zur Objektivierung von Schmerz als Stressor bislang vor allem bei Rindern untersucht und in verschiedenen Studien als geeigneter Parameter herausgearbeitet (Coetzee, Lubbers et al. 2008, Bustamante, Rodriguez et al. 2015, Barragan, Pineiro et al. 2018, Tschoner und Feist 2022). In einer Studie

mit Kälbern, welche einen signifikanten Anstieg der SP-Plasmakonzentration auf durchschnittlich $506,43 \pm 38,11$ pg/ml (Coetzee, Lubbers et al. 2008) nach Kastration zeigten, wurde Substanz P als einer der spezifischsten Biomarker für Schmerzen bei Rindern identifiziert (Bustamante, Rodriguez et al. 2015). Studien zur Stress- und Schmerzreaktion bei Milchkühen mit Lahmheit (Bustamante, Rodriguez et al. 2015) oder klinischer Metritis (Barragan, Pineiro et al. 2018) zeigten ebenfalls einen signifikanten Anstieg von Substanz P bei betroffenen Tieren. Die maximalen SP-Plasmakonzentrationen lagen hierbei jeweils bei $2,20 \pm 0,47$ ng/ml (Bustamante, Rodriguez et al. 2015) und $47,15 \pm 5,38$ ng/ml (Barragan, Pineiro et al. 2018). Auf die deutlich heterogenen Werte der Konzentrationen in verschiedenen Studien wurde dabei bereits hingewiesen (Tschoner und Feist 2022).

Bei Pferden haben sich verschiedene Studien mit Substanz P befasst, unter anderem als Neurotransmitter im Darm (Malone, Kannan et al. 2000) oder als beteiligtes Agens in der Synovia bei Gelenkerkrankungen (Caron, Bowker et al. 1992, Kirker-Head, Chandna et al. 2000). Eine Studie untersuchte SP neben anderen Stressmarkern bei Tennessee Walking Horses, welche im Rahmen des Trainings mit Ketten und keilförmigen Platten an ihren Vorderbeinen versehen wurden und fand keine Konzentrationserhöhung von SP im Plasma (Everett, Schumacher et al. 2018). Eine weitere Studie untersuchte Veränderungen von Plasma-Neuropeptidkonzentrationen in arteriellem und venösem Blut des Dickdarms während Ischämie und Reperfusion und fand heraus, dass während der frühen Reperusionsphase die SP-Konzentrationen im arteriellen Blut anstiegen (Moore, Charalambous et al. 1996). Abgesehen davon gibt es jedoch bislang kaum Studien zu Substanz P als Marker für Schmerzen oder Stress bei Pferden.

Die vorliegende Studie zeigt, dass Plasmakonzentrationen von SP bei Pferden regelmäßig und zuverlässig gemessen werden können. Die Ergebnisse zur Festlegung von Referenzwerten zeigten, wie bei Wiederkäuern, eine große Verteilungsbreite von SP-Konzentrationen zwischen Individuen. Die SP-Konzentrationen bei Pferden und Wiederkäuern sind ähnlich hoch und in ihrer heterogenen Verteilungsbreite vergleichbar. Bei Wiederkäuern unterscheiden sich die Konzentrationswerte zwischen verschiedenen Studien und Studiendesigns jedoch stärker als innerhalb einer Studie. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die SP-Plasmakonzentrationen von Pferden innerhalb dieser Studie deutlich, obwohl dasselbe Studienprotokoll für alle beteiligten Tiere verwendet wurde. Dies deutet

möglicherweise auf einen noch größeren Verteilungsbereich der SP-Plasmakonzentrationen bei Pferden als bei Rindern hin. Darüber hinaus zeigt SP innerhalb einzelner Individuen einen deutlich engeren Rahmen der SP-Werte als bei Betrachtung der gesamten Studienpopulation. Dies könnte darauf hindeuten, dass SP als ein mehr individueller Parameter bei Pferden angesehen werden muss, bei dem Änderungen der Konzentration innerhalb eines Individuums repräsentativer sind, als der Vergleich verschiedener Pferde. Andererseits kann dies die Festlegung allgemeiner Referenzwerte natürlich deutlich erschweren. Das in dieser Studie verwendete vierstufige Stressmodell beinhaltet die Verwendung weiter und enger Nasenriemen und die zusätzliche Anwendung eines Overground-Endoskops, wie es regelmäßig zur Untersuchung der oberen Atemwege bei Pferden Einsatz findet. Mehrere Studien haben bereits gezeigt, dass zu eng verschnallte Nasenriemen Stressreaktionen bei Pferden auslösen (Fenner, Yoon et al. 2016, Doherty, Casey et al. 2017), wobei der Stresseffekt durch ein Overground-Endoskop in diesem Zusammenhang nicht weiter untersucht wurde. Dennoch muss das Schieben eines Endoskops durch die Nasenhöhle bei nicht sedierten Pferden als ein nicht unerheblicher Stressor angenommen werden, was nicht nur durch regelmäßiges Abwehrverhalten repräsentiert wird. Auch das Reiten mit dem Overground-Endoskop erzeugt bei Pferden mutmaßlich zumindest eine Form von Stress und Unbehagen aufgrund des Fremdkörperreizes in Nase und Rachen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen einen linearen Anstieg von Cortisol im Serum, der mit den vier verschiedenen Stresslevels korreliert (entspricht den niedrigsten Cortisol-Konzentrationen im Serum bei Level 1 und den höchsten Konzentrationen bei Level 4 mit einem signifikanten Anstieg zwischen Level 1 und 4, 2 und 3, sowie 2 und 4), was auf eine ausreichende Stressreaktion und somit die Eignung des verwendeten Stressmodells hinweist. In Studien, in denen Pferde dagegen nur sehr geringem Stress (z.B. Longieren) ausgesetzt waren, kam es zu keinem Anstieg von Cortisol (Janzekovic und Prisenk 2017).

Die SP-Konzentrationen in unserem Stressmodell zeigten keine signifikante Korrelation zwischen SP und der Intensität der vier verschiedenen Stresslevels. Ein möglicher Grund dafür, dass SP nicht mit dem Stressmodell und den Cortisol-Konzentrationen korreliert, könnte darin liegen, dass die verwendeten Stressoren nicht stark genug waren (Ebner, Rupniak et al. 2004). Bei Wiederkäuern wurden SP-Konzentrationen hauptsächlich bei schmerzhafteren Krankheiten und

Behandlungen untersucht als die verwendeten geringfügigen Stressoren unseres Modells (Coetzee, Lubbers et al. 2008, Bustamante, Rodriguez et al. 2015). Obwohl die Pferde gestresst waren, konnte bei Betrachtung der Studien an Wiederkäuern festgestellt werden, dass für einen signifikanten Anstieg der SP-Konzentrationen ein viel stärkerer Stressor erforderlich ist. Daher sind weitere Untersuchungen zu SP-Konzentrationen in verschiedenen Stressmodellen oder an erkrankten Pferden, beispielsweise mit schwerer Lahmheit oder Koliken, erforderlich. Auch bei Wiederkäuern gibt es unterschiedliche Ergebnisse zur Korrelation zwischen Cortisol und Substanz P. Da SP bei Rindern als zuverlässiger Parameter gilt, wurde die Elektroejakulation in einer Studie als nicht schmerzhaft eingestuft, da die Konzentrationen von Substanz P trotz steigender Cortisolspiegel niedrig blieben (Whitlock, Coffman et al. 2012). Beim Menschen wurde in einer Studie die Wirkung von akutem psychischem Stress auf Beta-Endorphin- und Substanz-P-Plasmakonzentrationen untersucht (Schedlowski, Fluge et al. 1995). Während die Substanz-P-Spiegel durch Fallschirmspringen unbeeinflusst blieben, stiegen die Beta-Endorphin-Konzentrationen unmittelbar nach dem Absprung an (Schedlowski, Fluge et al. 1995). Bemerkenswert in dieser Studie war, dass Personen mit höherem Angstlevel höhere Gesamtkonzentrationen von Substanz P aufwiesen, während furchtlosere Springer eine niedrigere Gesamtkonzentration zeigten. Dies könnte auch der Grund für die beobachteten interindividuellen Unterschiede bei Pferden sein, was jedoch weiter in einer größeren Studienpopulation unter Berücksichtigung des individuellen Stresslevels der Pferde untersucht werden müsste.

Einen weiteren Hinweis darauf, dass das verwendete Stressmodell nicht als hochgradig einzustufen war, lieferten die Auswertungen der HRV. Während in anderen Studien bei Pferden beispielsweise mit deutlicher Lahmheit Veränderungen sichtbar waren (Soiluva, Hayrinen et al. 2023), zeigten die Pferde mit engem Nasenriemen in dieser Studie zwar im Durchschnitt eine geringere HRV und somit ein höheres Stresslevel, jedoch keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit den Pferden mit weitem Nasenriemen. Auch in anderen Studien waren Stress und Schmerzen bei Pferden mit einer niedrigen HRV assoziiert (Visser, van Reenen et al. 2002, Schmidt, Mostl et al. 2010, Becker-Birck, Schmidt et al. 2013, McConachie, Giguere et al. 2016). Eine signifikante Korrelation der HRV mit dem Stressmodell dieser Studie war jedoch nicht nachzuvollziehen.

Mit dem RHE wurden stressassoziierte Verhaltensweisen der Pferde unter dem Sattel bewertet und quantifiziert. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Pferde, die mit einem sehr engen Nasenriemen geritten wurden, Stress nur sehr begrenzt in deren Gesichtsausdruck zeigen (Dyson und Pollard 2020). In unserer Studie wurde dies dahingehend deutlich, dass Pferde in der Gruppe mit engem Nasenriemen vermehrt auf andere stressassoziierte Verhaltensweisen zurückgriffen. Während die Gruppe mit weitem Nasenriemen hauptsächlich Verhaltensweisen wie Schiefhaltung des Kopfes, einen vor der Senkrechten getragenen Kopf, sowie vermehrtes Öffnen des Mauls zeigte, wiesen Pferde, die ihr Maul aufgrund des engen Nasenriemens nicht öffnen konnten, vor allem Zurückverlagern des Kopfes hinter die Senkrechte, nach hinten gedrehte Ohren, geschlossene Augenlider, sichtbare Skleren oder intensives Starren auf. Diese überwiegend passiven Verhaltensweisen wurden zum Teil bereits in der Literatur als so genannte „erlernte Hilflosigkeit“ bezeichnet (Hall, Goodwin et al. 2008). Dies war ein interessantes Ergebnis, welches zeigte, dass das RHE möglicherweise nicht nur geeignet ist, schmerzhaft Zustände bei Pferden zu erkennen, sondern auch emotional belastende Situationen. Allerdings korrelierten die RHE-Scores weder mit den Cortisol-Konzentrationen noch mit den Substanz-P oder Alpha-Amylase Werten.

Eine Einschränkung der vorliegenden Studie war die Tatsache, dass das Bewertungssystem des RHE nur berücksichtigte, ob die verschiedenen Parameter von einem einzelnen Pferd gezeigt wurden, aber nicht, wie oft oder wie lange. Manche Pferde zeigten einzelne Parameter nur kurz, andere zeigten sie dauerhaft oder wiederholt, besonders wenn sie mit engem Nasenriemen geritten wurden. Diese Tatsache spiegelt sich in dem hier verwendeten Ridden Horse Ethogram nicht wider. Eine kürzlich erschienene Studie zeigte auf, dass das RHE alleine möglicherweise nicht ausreicht, um alle Aspekte, die zu einem suboptimalen Wohlbefinden gerittener Pferde beitragen können, zu erfassen. Ebenso ist die Gleichgewichtung aller Parameter des RHE ohne Evidenzbasis dafür kritisch zu sehen (Ladewig, McLean et al. 2022). In unserer Studie zeigten die Ergebnisse deutlich die Zuverlässigkeit von sichtbarem Stress und Bewältigungsstrategien, wenn Pferde Stressoren wie einem engen Nasenriemen oder einem Overground-Endoskop ausgesetzt waren. Obwohl es sich immer noch um ein subjektives Instrument handelt, das von der Expertise des Untersuchers abhängt, kann die Verwendung des RHE bei Pferden unter dem Reiter helfen, ungeeignete

Trainingsmethoden im Pferdesport zu identifizieren.

Eine weitere Einschränkung dieser Studie könnte darin bestehen, dass Substanz P aus dem Plasma gemessen wurde, anstatt, wie in vielen anderen Studien, aus dem Gehirngewebe selbst (Aguiar und Brandao 1996, Ebner, Rupniak et al. 2004, Ebner und Singewald 2006). Beispielsweise ist die Freisetzung von Substanz P in bestimmten Regionen der Amygdala, die bekanntermaßen als Schlüsselbereich bei der Verarbeitung von Emotionen gilt, oder im zentralen Höhlengrau bei Ratten, sensitiv gegenüber emotionalen Stressoren. Eine Studie bei Menschen untersuchte sogar den SP-Gehalt von an Schuppenflechte erkrankter und gesunder Haut und fand eine erhöhte Anzahl SP- und NK-1-Rezeptor-positiver Entzündungszellen in nicht betroffenen Arealen von an Schuppenflechte erkrankten Hautbezirken als Reaktion auf chronischen Stress (Remrod, Lonne-Rahm et al. 2007). Da Studien an Menschen und Wiederkäuern jedoch eindeutig einen messbaren Anstieg der Substanz-P-Konzentration in Plasma gezeigt haben, wurde dennoch in dieser Studie Plasma gewählt, um SP auf seine Eignung als Parameter im Zusammenhang mit der Stresserkennung und -bewertung lebender, gerittener Pferde zu untersuchen.

Eine mögliche Erklärung für das Fehlen eines deutlichen Anstiegs von SP könnte die Tatsache sein, dass die meisten der in dieser Studie verwendeten Pferde sehr erfahrene Schulpferde waren, die an zahlreiche unterschiedliche Stressoren, wie eine große Anzahl ständig wechselnder und/oder unerfahrener Reiter gewöhnt waren. Darüber hinaus ist nicht bekannt, inwiefern diese Pferde möglicherweise an enge Nasenriemen gewöhnt waren, da es keine Informationen darüber gab, wie sie bislang im Rahmen ihrer Reitstunden geritten wurden. Gewöhnungseffekte an mäßige Stressoren während dieser Reitstunden können also auch zu Bewältigungsstrategien geführt haben, welche in ineffektiven Voraussetzungen für signifikante SP oder Alpha-Amylase Anstiege resultiert haben können. Um dies zu verifizieren wäre ein Vergleich mit jungen, unerfahrenen Pferden im gleichen Stressmodell denkbar, um weitere Informationen über die Wirksamkeit des verwendeten Stressmodells für SP und Serum-Alpha-Amylase als Biomarker für Stress bei Pferden zu erlangen.

Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die SP- und Alpha-Amylase-Werte nicht geeignet waren, um emotionalen Stress in unserem vierstufigen Stress-Modell zu quantifizieren. Da Cortisol analog zum Stresslevel anstieg, SP und Alpha-Amylase aber nicht, macht es deren Verwendung als Stressparameter in diesem Zusammenhang zumindest fragwürdig. Weitere Studien sind erforderlich, um mehr Informationen über die SP-Werte in Abhängigkeit vom Stressniveau des individuellen Pferdes zu erhalten und beide Parameter bei Pferden, die größerem Stress oder schmerzhaften Zuständen (z. B. Koliken) ausgesetzt sind, zu bewerten.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Tierschutz im Reitsport steht immer wieder im Fokus öffentlicher Aufmerksamkeit. Vor allem verschiedene Ausbildungsmethoden von Pferden, sowie Turnier- und Reitsportveranstaltungen stehen dabei immer wieder im Zentrum der Kritik. Auch korrekt verschnallte Nasenriemen haben in diesem Zusammenhang in den letzten Jahren immer wieder eine wichtige Rolle gespielt. Weiterhin kommt einer Objektivierung von Stress- und Angstreaktionen bei Pferden mit Hilfe geeigneter Messmethoden immer mehr Bedeutung zu. Neben der Bestimmung von Cortisol aus Serum- oder Speichelproben wurde ein Ridden Horse Ethogram entwickelt, um unerwünschte Reaktionen und schmerzassoziiertes Verhalten bei Pferden unter dem Reiter quantifizieren zu können.

Diese Studie zielte darauf ab, mit Hilfe eines vierstufigen Stressmodells neue Stressparameter zu evaluieren. Dabei wurde neben Alpha-Amylase vor allem Substanz P als Marker für emotionale Stressreaktionen untersucht. Eines der Ziele bestand darin, neben der Erstellung von Referenzwerten für Alpha-Amylase und Substanz P bei Pferden, deren Aktivitäten bzw. Konzentrationen mit dem etablierten Stressparameter Cortisol zu vergleichen. Diese biochemischen Stressparameter wurden mit weiteren etablierten Stressparametern verglichen, wie beispielsweise der Herzfrequenzvariabilität, sowie dem oben genannten Ridden Horse Ethogram, um auch verhaltensbezogene Stressreaktionen bewerten zu können. Die Plasmakonzentrationen von Substanz P zeigten große interindividuelle Schwankungen, während sie sich bei einzelnen Pferden in engeren Grenzen bewegten. Während Cortisol bei den vier angewandten Belastungsstufen (Stufe 1: Pferde geritten mit weitem Nasenriemen, Stufe 2: enger Nasenriemen, Stufe 3: weiter Nasenriemen und Overground-Endoskop, Stufe 4: enger Nasenriemen und Overground-Endoskop) linear anstieg, zeigten weder die Substanz-P-Konzentrationen im Plasma, noch Alpha-Amylase Aktivitäten im Serum eine Korrelation mit Cortisol oder dem Stressmodell. Die beiden Parameter sind daher möglicherweise nicht geeignet, um Stress bzw. im Fall von SP vor allem emotionalen Stress bei Pferden im vorliegenden Stressmodell nachzuweisen. Weitere Studien sind daher notwendig, um mehr Informationen über die Bedeutung von Substanz P und Alpha-Amylase als Stressparameter bei Pferden zu erhalten, beispielsweise unter Verwendung eines stärkeren Stressmodells.

VI. SUMMARY

Public perception of animal welfare in equestrian sport depends primarily on factors related to training methods and the presentation of horses at equestrian events. Correctly buckled nosebands have repeatedly played an important role in recent years. Furthermore, objective methods for measuring stress and anxiety reactions in horses were needed. In addition to the determination of cortisol from serum or saliva samples, ridden horse ethograms were developed to quantify adverse reactions and pain-associated behavior in ridden horses.

This study aimed to use a stress model with four different stress levels to evaluate substance P and alpha amylase as new stress parameters. Those parameters were chosen to mainly address emotional stress reactions. One of the goals, besides establishing reference values for alpha amylase and substance P in horses, was to compare their activities or concentrations with the established stress parameter cortisol. Furthermore, these biochemical stress parameters were compared to other established stress variables, such as heart rate variability and a ridden horse ethogram, to also be able to evaluate behavioral stress reactions. The plasma concentrations of substance P showed large inter-individual variations, while they were within more narrow limits in individual horses. While cortisol showed a linear increase with the four applied stress levels (level 1: horses ridden with a loose noseband, level 2: tight noseband, level 3: loose noseband and overground endoscope, level 4: tight noseband and overground endoscope) neither substance P concentrations in the plasma, nor alpha amylase activities in the serum correlated with cortisol or the stress levels. In conclusion, they are probably not suitable for quantifying (emotional) stress in the present stress model. Further studies are therefore needed to gain more information about the importance of substance P and alpha-amylase as stress parameters in horses, for example using a more powerful stress model.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Aguiar, M. S. and M. L. Brandao (1996). "Effects of microinjections of the neuropeptide substance P in the dorsal periaqueductal gray on the behaviour of rats in the plus-maze test." Physiol Behav **60**(4): 1183-1186.

Ayala, I., N. F. Martos, G. Silvan, C. Gutierrez-Panizo, J. G. Clavel and J. C. Illera (2012). "Cortisol, adrenocorticotrophic hormone, serotonin, adrenaline and noradrenaline serum concentrations in relation to disease and stress in the horse." Res Vet Sci **93**(1): 103-107.

Barakzai, S. and P. Dixon (2011). "Correlation of resting and exercising endoscopic findings for horses with dynamic laryngeal collapse and palatal dysfunction." Equine Veterinary Journal **43**(1): 18-23.

Barragan, A. A., J. M. Pineiro, G. M. Schuenemann, P. J. Rajala-Schultz, D. E. Sanders, J. Lakritz and S. Bas (2018). "Assessment of daily activity patterns and biomarkers of pain, inflammation, and stress in lactating dairy cows diagnosed with clinical metritis." J Dairy Sci **101**(9): 8248-8258.

Baucus, K. L., E. L. Squires, S. L. Ralston, A. O. McKinnon and T. M. Nett (1990). "Effect of transportation on the estrous cycle and concentrations of hormones in mares." J Anim Sci **68**(2): 419-426.

Baum, B. J. (1993). "Principles of saliva secretion." Ann N Y Acad Sci **694**: 17-23.

Becker-Birck, M., A. Schmidt, J. Lasarzik, J. Aurich, E. Möstl and C. Aurich (2013). "Cortisol release and heart rate variability in sport horses participating in equestrian competitions." Journal of Veterinary Behavior **8**(2): 87-94.

Becker-Birck, M., A. Schmidt, M. Wulf, J. Aurich, A. von der Wense, E. Mostl, R. Berz and C. Aurich (2013). "Cortisol release, heart rate and heart rate variability, and superficial body temperature, in horses lunged either with hyperflexion of the neck or with an extended head and neck position." J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)

97(2): 322-330.

Broche, N., Jr., R. S. C. Takeshita, K. Mouri, F. B. Bercovitch and M. A. Huffman (2019). "Salivary alpha-amylase enzyme is a non-invasive biomarker of acute stress in Japanese macaques (*Macaca fuscata*)." Primates **60**(6): 547-558.

Bustamante, H. A., A. R. Rodriguez, D. E. Herzberg and M. P. Werner (2015). "Stress and pain response after oligofructose induced-lameness in dairy heifers." J Vet Sci **16**(4): 405-411.

Campbell, J. and U. Ehlert (2012). "Acute psychosocial stress: does the emotional stress response correspond with physiological responses?" Psychoneuroendocrinology **37**(8): 1111-1134.

Caron, J. P., R. M. Bowker, R. H. Abhold, D. S. Toppin, I. M. Sonea and K. B. Vex (1992). "Substance P in the synovial membrane and fluid of the equine middle carpal joint." Equine Vet J **24**(5): 364-366.

Carrasco, G. A. and L. D. Van de Kar (2003). "Neuroendocrine pharmacology of stress." Eur J Pharmacol **463**(1-3): 235-272.

Carroll, S. L., B. W. Sykes and P. C. Mills (2022). "Moving toward Fear-Free Husbandry and Veterinary Care for Horses." Animals (Basel) **12**(21).

Christensen, J. W., M. Beekmans, M. van Dalum and M. VanDierendonck (2014). "Effects of hyperflexion on acute stress responses in ridden dressage horses." Physiol Behav **128**: 39-45.

Clayton, H. M. and J. M. Williams (2022). "Know your noseband: An exploration of factors that influence riders' choice of noseband." Journal of Veterinary Behavior **47**: 1-11.

Coetzee, J. F., B. V. Lubbers, S. E. Toerber, R. Gehring, D. U. Thomson, B. J.

White and M. D. Apley (2008). "Plasma concentrations of substance P and cortisol in beef calves after castration or simulated castration." Am J Vet Res **69**(6): 751-762.

Coizet, B., L. Nicoloso, D. Marletta, A. Tamiozzo-Calligarich, G. Pagnacco and P. Crepaldi (2014). "Variation in salivary and pancreatic alpha-amylase genes in Italian horse breeds." J Hered **105**(3): 429-435.

Colborn, D. R., D. L. Thompson, Jr., T. L. Roth, J. S. Capehart and K. L. White (1991). "Responses of cortisol and prolactin to sexual excitement and stress in stallions and geldings." J Anim Sci **69**(6): 2556-2562.

Contreras-Aguilar, M. D., J. J. Ceron, A. Munoz and I. Ayala (2021). "Changes in saliva biomarkers during a standardized increasing intensity field exercise test in endurance horses." Animal **15**(6): 100236.

Contreras-Aguilar, M. D., D. Escribano, M. Martin-Cuervo, F. Tecles and J. J. Ceron (2018). "Salivary alpha-amylase activity and cortisol in horses with acute abdominal disease: a pilot study." BMC Vet Res **14**(1): 156.

Contreras-Aguilar, M. D., S. Henry, C. Coste, F. Tecles, D. Escribano, J. J. Ceron and M. Hausberger (2019). "Changes in Saliva Analytes Correlate with Horses' Behavioural Reactions to An Acute Stressor: A Pilot Study." Animals (Basel) **9**(11).

Contreras-Aguilar, M. D., M. L. Hevia, D. Escribano, E. Lamy, F. Tecles and J. J. Ceron (2020). "Effect of food contamination and collection material in the measurement of biomarkers in saliva of horses." Res Vet Sci **129**: 90-95.

Contreras-Aguilar, M. D., E. Lamy, D. Escribano, J. J. Ceron, F. Tecles, A. J. Quiles and M. L. Hevia (2020). "Changes in Salivary Analytes of Horses Due to Circadian Rhythm and Season: A Pilot Study." Animals (Basel) **10**(9).

Contreras-Aguilar, M. D., S. Martinez-Subiela, J. J. Ceron, M. Martin-Cuervo, F. Tecles and D. Escribano (2019). "Salivary alpha-amylase activity and concentration in horses with acute abdominal disease: Association with outcome." Equine Vet J **51**(5): 569-574.

Dacre, K., R. Pirie, C. Scudamore and D. Prince (2003). "Hyperlipaemia and pancreatitis in a pony with Cushing's disease." Equine Veterinary Education **15**(4): 175-181.

Dalla Costa, E., M. Minero, D. Lebelt, D. Stucke, E. Canali and M. C. Leach (2014). "Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a pain assessment tool in horses undergoing routine castration." PLoS One **9**(3): e92281.

Döcke, F., Ed. (1994). Veterinärmedizinische Endokrinologie. Jena Stuttgart, Enke Verlag.

Doherty, O., V. Casey, P. McGreevy and S. Arkins (2017). "Noseband Use in Equestrian Sports - An International Study." PLoS One **12**(1): e0169060.

Doherty, O., T. Conway, R. Conway, G. Murray and V. Casey (2017). "An Objective Measure of Noseband Tightness and Its Measurement Using a Novel Digital Tightness Gauge." PLoS One **12**(1): e0168996.

Duke, D. (2017). The effects of a variation in noseband tightness on the rein tension of the ridden horse, University of Plymouth.

Dyson, S., J. Berger, A. D. Ellis and J. Mullard (2018). "Development of an ethogram for a pain scoring system in ridden horses and its application to determine the presence of musculoskeletal pain." Journal of Veterinary Behavior **23**: 47-57.

Dyson, S. and A. Ellis (2022). "Application of a Ridden Horse Pain Ethogram to horses competing at 5-star three-day-events: Comparison with performance." Equine Veterinary Education **34**(6): 306-315.

Dyson, S. and D. Pollard (2020). "Application of a Ridden Horse Pain Ethogram and Its Relationship with Gait in a Convenience Sample of 60 Riding Horses." Animals (Basel) **10**(6).

Dyson, S. and D. Pollard (2021). "Application of the Ridden Horse Pain Ethogram to Elite Dressage Horses Competing in World Cup Grand Prix Competitions." Animals (Basel) **11**(5).

Dyson, S. and D. Pollard (2021). "Application of the Ridden Horse Pain Ethogram to Horses Competing at the Hickstead-Rotterdam Grand Prix Challenge and the British Dressage Grand Prix National Championship 2020 and Comparison with World Cup Grand Prix Competitions." Animals (Basel) **11**(6).

Dyson, S. and D. Pollard (2022). "Application of the Ridden Horse Pain Ethogram to Horses Competing in British Eventing 90, 100 and Novice One-Day Events and Comparison with Performance." Animals (Basel) **12**(5).

Ebner, K., P. Muigg, G. Singewald and N. Singewald (2008). "Substance P in stress and anxiety: NK-1 receptor antagonism interacts with key brain areas of the stress circuitry." Ann N Y Acad Sci **1144**: 61-73.

Ebner, K., N. M. Rupniak, A. Saria and N. Singewald (2004). "Substance P in the medial amygdala: emotional stress-sensitive release and modulation of anxiety-related behavior in rats." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(12): 4280-4285.

Ebner, K. and N. Singewald (2006). "The role of substance P in stress and anxiety responses." Amino Acids **31**(3): 251-272.

Everett, J. B., J. Schumacher, T. J. Doherty, R. A. Black, L. L. Amelse, P. Krawczel, J. F. Coetzee and B. K. Whitlock (2018). "Effects of stacked wedge pads and chains applied to the forefeet of Tennessee Walking Horses for a five-day period on behavioral and biochemical indicators of pain, stress, and inflammation." Am J Vet Res **79**(1): 21-32.

FEI. (2019). "Federation Equestre Internationale. 2009. Updated 2019. Stewards Manual Dressage. Switzerland." from https://inside.fei.org/sites/default/files/Dressage%20Stewards%20Manual%202019_clean_update202010.202011.202021.pdf.

FEI. (2023). "Federation Equestre Internationale. 2023. Dressage Rules. 26th Edition. Switzerland." from https://inside.fei.org/sites/default/files/FEI_Dressage_Rules_2023_Clean_Version_Updated_2024-2001-2023.pdf.

Feickert, M. and B. B. Burckhardt (2019). "Substance P in cardiovascular diseases – A bioanalytical review." *Clinica Chimica Acta* **495**: 501-506.

Fenner, K., S. Yoon, P. White, M. Starling and P. McGreevy (2016). "The Effect of Noseband Tightening on Horses' Behavior, Eye Temperature, and Cardiac Responses." *PLoS One* **11**(5): e0154179.

Franzini, C. and P. A. Bonini (1969). "Lack of alpha-amylase in horse serum." *Experientia* **25**(6): 597-598.

Fuentes-Rubio, M., F. Fuentes, J. Otal, A. Quiles and M. L. Hevia (2016). "Validation of an assay for quantification of alpha-amylase in saliva of sheep." *Can J Vet Res* **80**(3): 197-202.

Fuentes-Rubio, M., F. Fuentes, J. Otal, A. Quiles, F. Tecles, J. J. Cerón and M. L. Hevia (2015). "Measurements of salivary alpha-amylase in horse: Comparison of 2 different assays." *Journal of Veterinary Behavior* **10**(2): 122-127.

Fuentes, M., F. Tecles, A. Gutierrez, J. Otal, S. Martinez-Subiela and J. J. Ceron (2011). "Validation of an automated method for salivary alpha-amylase measurements in pigs (*Sus scrofa domesticus*) and its application as a stress biomarker." *J Vet Diagn Invest* **23**(2): 282-287.

Fureix, C., M. Bourjade, S. Henry, C. Sankey and M. Hausberger (2012). "Exploring aggression regulation in managed groups of horses *Equus caballus*." Applied Animal Behaviour Science **138**(3-4): 216-228.

Fureix, C., P. Jegou, S. Henry, L. Lansade and M. Hausberger (2012). "Towards an ethological animal model of depression? A study on horses." PLoS One **7**(6): e39280.

Gaidica, M. and B. Dantzer (2020). "Quantifying the Autonomic Response to Stressors-One Way to Expand the Definition of "Stress" in Animals." Integr Comp Biol **60**(1): 113-125.

Gleerup, K. B., B. Forkman, C. Lindegaard and P. H. Andersen (2015). "An equine pain face." Vet Anaesth Analg **42**(1): 103-114.

Gregg, T. R. and A. Siegel (2001). "Brain structures and neurotransmitters regulating aggression in cats: implications for human aggression." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **25**(1): 91-140.

Hall, C., D. Goodwin, C. Heleski, H. Randle and N. Waran (2008). "Is there evidence of learned helplessness in horses?" J Appl Anim Welf Sci **11**(3): 249-266.

Hall, C., N. Huws, C. White, E. Taylor, H. Owen and P. McGreevy (2013). "Assessment of ridden horse behavior." Journal of Veterinary Behavior **8**(2): 62-73.

Heleski, C. R., P. D. McGreevy, L. J. Kaiser, M. Lavagnino, E. Tans, N. Bello and H. M. Clayton (2009). "Effects on behaviour and rein tension on horses ridden with or without martingales and rein inserts." Vet J **181**(1): 56-62.

Hellhammer, D. H., S. Wüst and B. M. Kudielka (2009). "Salivary cortisol as a biomarker in stress research." Psychoneuroendocrinology **34**(2): 163-171.

Herbert, M. K. and P. Holzer (2002). "[Why are substance P(NK1)-receptor antagonists ineffective in pain treatment?]." Anaesthetist **51**(4): 308-319.

Hjermstad, M. J., P. M. Fayers, D. F. Haugen, A. Caraceni, G. W. Hanks, J. H. Loge, R. Fainsinger, N. Aass, S. Kaasa and C. European Palliative Care Research (2011). "Studies comparing Numerical Rating Scales, Verbal Rating Scales, and Visual Analogue Scales for assessment of pain intensity in adults: a systematic literature review." J Pain Symptom Manage **41**(6): 1073-1093.

Hong, H. R., Y. I. Oh, Y. J. Kim and K. W. Seo (2019). "Salivary alpha-amylase as a stress biomarker in diseased dogs." J Vet Sci **20**(5): e46.

Iftikhar, K., A. Siddiq, S. G. Baig and S. Zehra (2020). "Substance P: A neuropeptide involved in the psychopathology of anxiety disorders." Neuropeptides **79**: 101993.

Ille, N., M. Von Lewinski, R. Erber, M. Wulf, J. Aurich, E. Möstl and C. Aurich (2013). "Effects of the level of experience of horses and their riders on cortisol release, heart rate and heart-rate variability during a jumping course." Animal Welfare **22**(4): 457-465.

James, V. H., M. W. Horner, M. S. Moss and A. E. Rippon (1970). "Adrenocortical function in the horse." J Endocrinol **48**(3): 319-335.

Janowitz, H. D. and D. A. Dreiling (1959). "The plasma amylase. Source, regulation and diagnostic significance." Am J Med **27**: 924-935.

Janzekovic, M. and J. Prisenk (2017). "Assessment of stress on horses through the salivary cortisol concentration." DAAAM International Scientific Book: 055-062.

Jessop, D. S., D. Renshaw, P. J. Larsen, H. S. Chowdrey and M. S. Harbuz (2000). "Substance P is involved in terminating the hypothalamo- pituitary-adrenal axis response to acute stress through centrally located neurokinin-1 receptors." Stress

3(3): 209-220.

Joseph, D. N. and S. Whirledge (2017). "Stress and the HPA Axis: Balancing Homeostasis and Fertility." Int J Mol Sci **18**(10).

Kimura, R., S. Borankulova and S. Z. Maratbek (2023). "Effect of difference in training skills on stress in horses trained by Kazakh trainers." Anim Sci J **94**(1): e13800.

Kinnunen, S., R. Laukkanen, J. Haldi, O. Hanninen and M. Atalay (2006). "Heart rate variability in trotters during different training periods." Equine Vet J Suppl(36): 214-217.

Kirker-Head, C. A., V. K. Chandna, R. K. Agarwal, E. A. Morris, A. Tidwell, M. W. O'Callaghan, W. Rand and M. S. A. Kumar (2000). "Concentrations of substance P and prostaglandin E2 in synovial fluid of normal and abnormal joints of horses." American Journal of Veterinary Research **61**(6): 714-718.

Koolhaas, J. M., A. Bartolomucci, B. Buwalda, S. F. de Boer, G. Flügge, S. M. Korte, P. Meerlo, R. Murison, B. Olivier, P. Palanza, G. Richter-Levin, A. Sgoifo, T. Steimer, O. Stiedl, G. van Dijk, M. Wöhr and E. Fuchs (2011). "Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept." Neuroscience & Biobehavioral Reviews **35**(5): 1291-1301.

Krueger, K., L. Esch, K. Farmer and I. Marr (2021). "Basic Needs in Horses?-A Literature Review." Animals (Basel) **11**(6).

Kuwahara, M., S.-i. Hashimoto, K. Ishii, Y. Yagi, T. Hada, A. Hiraga, M. Kai, K. Kubo, H. Oki, H. Tsubone and S. Sugano (1996). "Assessment of autonomic nervous function by power spectral analysis of heart rate variability in the horse." Journal of the Autonomic Nervous System **60**(1): 43-48.

Ladewig, J., A. N. McLean, C. L. Wilkins, K. Fenner, J. W. Christensen and P. D.

McGreevy (2022). "A review of The Ridden Horse pain Ethogram and its potential to improve ridden horse welfare." Journal of Veterinary Behavior **54**: 54-61.

Lee, K. E., J. G. Kim, H. Lee and B. S. Kim (2021). "Behavioral and cardiac responses in mature horses exposed to a novel object." J Anim Sci Technol **63**(3): 651-661.

Lopresti, A. L. (2020). "The Effects of Psychological and Environmental Stress on Micronutrient Concentrations in the Body: A Review of the Evidence." Adv Nutr **11**(1): 103-112.

LPO (2023). LPO-Ausrüstungskatalog. Disziplinen: Dressur, Springen, Vielseitigkeit. Deutsche Reiterliche Vereinigung e.V. (FN) 2023.

Lu, S., F. Wei and G. Li (2021). "The evolution of the concept of stress and the framework of the stress system." Cell Stress **5**(6): 76-85.

Malone, E. D., M. S. Kannan and D. R. Brown (2000). "Evaluation of substance P as a neurotransmitter in equine jejunum." Am J Vet Res **61**(10): 1178-1184.

Mandal, N., M. Bhattacharjee, A. Chattopadhyay and D. Bandyopadhyay (2019). "Point-of-care-testing of alpha-amylase activity in human blood serum." Biosens Bioelectron **124-125**: 75-81.

Mashaghi, A., A. Marmalidou, M. Tehrani, P. M. Grace, C. Pothoulakis and R. Dana (2016). "Neuropeptide substance P and the immune response." Cell Mol Life Sci **73**(22): 4249-4264.

McClure, J. J. (1987). Acute pancreatitis. In: Current Therapy in Equine Medicine, 2nd edn, N. E. Robinson, ed., pp. 46–47. W.B. Saunders, Philadelphia.

McConachie, E. L., S. Giguere, G. Rapoport and M. H. Barton (2016). "Heart rate

variability in horses with acute gastrointestinal disease requiring exploratory laparotomy." J Vet Emerg Crit Care (San Antonio) **26**(2): 269-280.

McGreevy, P. (2011). "The fine line between pressure and pain: Ask the horse." The Veterinary Journal **3**(188): 250-251.

McGreevy, P., A. Warren-Smith and Y. Guisard (2012). "The effect of double bridles and jaw-clamping crank nosebands on temperature of eyes and facial skin of horses." Journal of veterinary behavior **7**(3): 142-148.

McGreevy, P. D. (2007). "The advent of equitation science." Vet J **174**(3): 492-500.

McLean, S., A. H. Ganong, T. F. Seeger, D. K. Bryce, K. G. Pratt, L. S. Reynolds, C. J. Siok, J. A. Lowe, 3rd and J. Heym (1991). "Activity and distribution of binding sites in brain of a nonpeptide substance P (NK1) receptor antagonist." Science **251**(4992): 437-439.

Merkies, K., C. Copelin, N. Small and J. Young (2022). "Noseband Fit: Measurements and Perceptions of Canadian Equestrians." Animals (Basel) **12**(19).

Mitchell, K. J. and C. C. Schwarzwald (2021). "Heart rate variability analysis in horses for the diagnosis of arrhythmias." The Veterinary Journal **268**: 105590.

Moberg, G. P. (2000). Biological response to stress: implications for animal welfare. The biology of animal stress: Basic principles and implications for animal welfare., CABI publishing Wallingford UK: 1-21.

Mohr, E., E. Witte and B. Voss (2000). "Heart rate variability as stress indicator." Archiv fur Tierzucht **43**: 171-176.

Moore, R. M., A. C. Charalambous and J. Masty (1996). "Alterations in colonic arterial and venous plasma neuropeptide concentrations in horses during low-flow ischemia and reperfusion of the large colon." Am J Vet Res **57**(8): 1200-1205.

Newman, S. J. (2015). "Equine pancreatic disease: A review and characterization of the lesions of four cases (2005–2014)." Journal of Veterinary Diagnostic Investigation **27**(1): 92-96.

Nieber, K. and P. Oehme (1982). "[Substance P - a neuropeptide transmitter]." Z Gesamte Inn Med **37**(18): 577-582.

Oakley, R. H. and J. A. Cidlowski (2011). "Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids." J Biol Chem **286**(5): 3177-3184.

Oehme, P., K. Hecht, H. D. Faulhaber, K. Nieber, I. Roske and R. Rathsack (1987). "Relationship of substance P to catecholamines, stress, and hypertension." J Cardiovasc Pharmacol **10 Suppl 12**: S109-111.

Peeters, M., C. Closson, J.-F. Beckers and M. Vandenheede (2013). "Rider and Horse Salivary Cortisol Levels During Competition and Impact on Performance." Journal of Equine Veterinary Science **33**(3): 155-160.

Peeters, M., J. Sulon, J. F. Beckers, D. Ledoux and M. Vandenheede (2011). "Comparison between blood serum and salivary cortisol concentrations in horses using an adrenocorticotrophic hormone challenge." Equine veterinary journal **43**(4): 487-493.

Perez-Manrique, L., K. Leon-Perez, E. Zamora-Sanchez, S. Davies, C. Ober, B. Wilson and P. McGreevy (2020). "Prevalence and Distribution of Lesions in the Nasal Bones and Mandibles of a Sample of 144 Riding Horses." Animals (Basel) **10**(9).

Placci, M., G. Marliani, S. Sabioni, G. Gabai, E. Mondo, P. Borghetti, E. De Angelis and P. A. Accorsi (2020). "Natural Horse Boarding Vs Traditional Stable: A Comparison of Hormonal, Hematological and Immunological Parameters." J Appl Anim Welf Sci **23**(3): 366-377.

Pollock, P., R. Reardon, T. Parkin, M. Johnston, J. Tate and S. Love (2009). "Dynamic respiratory endoscopy in 67 Thoroughbred racehorses training under normal ridden exercise conditions." Equine veterinary journal **41**(4): 354-360.

Potier, J. F. and V. Louzier (2023). "Evaluation of stress markers in horses during hippotherapy sessions in comparison to being ridden by beginners." Animal Welfare **32**: e10.

Remrod, C., S. Lonne-Rahm and K. Nordlind (2007). "Study of substance P and its receptor neurokinin-1 in psoriasis and their relation to chronic stress and pruritus." Arch Dermatol Res **299**(2): 85-91.

Rhodes, M. (2016). "Adrenocorticotrophic hormone." Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology: Handbook of Stress Series **2**: 2.

Rohleder, N. and U. M. Nater (2009). "Determinants of salivary alpha-amylase in humans and methodological considerations." Psychoneuroendocrinology **34**(4): 469-485.

Rosen, A., K. Brodin, P. Eneroth and E. Brodin (1992). "Short-term restraint stress and s.c. saline injection alter the tissue levels of substance P and cholecystokinin in the peri-aqueductal grey and limbic regions of rat brain." Acta Physiol Scand **146**(3): 341-348.

Sammito, S. and I. Bockelmann (2015). "[Analysis of heart rate variability. Mathematical description and practical application]." Herz **40 Suppl 1**: 76-84.

Sauer, F. J., M. Hermann, A. Ramseyer, D. Burger, S. Riemer and V. Gerber (2019). "Effects of breed, management and personality on cortisol reactivity in sport horses." PLoS One **14**(12): e0221794.

Schedlowski, M., T. Fluge, S. Richter, U. Tewes, R. E. Schmidt and T. O. Wagner (1995). "Beta-endorphin, but not substance-P, is increased by acute stress in

humans." Psychoneuroendocrinology **20**(1): 103-110.

Schiweck, C., D. Piette, D. Berckmans, S. Claes and E. Vrieze (2019). "Heart rate and high frequency heart rate variability during stress as biomarker for clinical depression. A systematic review." Psychol Med **49**(2): 200-211.

Schmidt, A., E. Mostl, C. Wehnert, J. Aurich, J. Muller and C. Aurich (2010). "Cortisol release and heart rate variability in horses during road transport." Horm Behav **57**(2): 209-215.

Shapiro, P. A., R. P. Sloan, E. M. Horn, M. M. Myers and J. M. Gorman (1993). "Effect of innervation on heart rate response to mental stress." Arch Gen Psychiatry **50**(4): 275-279.

Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. M., M. B. Blok, L. Begeman, M. C. Kamphuis, M. C. Lameris, A. J. Spierenburg and M. J. Lashley (2006). "Workload and stress in horses: comparison in horses ridden deep and round ('rollkur') with a draw rein and horses ridden in a natural frame with only light rein contact." Tijdschr Diergeneeskd **131**(5): 152-157.

Smith, S. M. and W. W. Vale (2006). "The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress." Dialogues Clin Neurosci **8**(4): 383-395.

Snow, D. H. and R. J. Rose (1981). "Hormonal changes associated with long distance exercise." Equine Vet J **13**(3): 195-197.

Soiluva, J., L. Hayrinen, G. Gangini, R. Oistamo, L. A. Gracia-Calvo and M. R. Raekallio (2023). "Comparison of asymmetry during trot in-hand with evaluations of discomfort and pain in horses while exercised." J Equine Vet Sci: 104282.

Sosulina, L., C. Strippel, H. Romo-Parra, A. L. Walter, T. Kanyshkova, S. B. Sartori, M. D. Lange, N. Singewald and H. C. Pape (2015). "Substance P excites

GABAergic neurons in the mouse central amygdala through neurokinin 1 receptor activation." J Neurophysiol **114**(4): 2500-2508.

Stephens, M. A. and G. Wand (2012). "Stress and the HPA axis: role of glucocorticoids in alcohol dependence." Alcohol Res **34**(4): 468-483.

Stucke, D., M. Große Ruse and D. Lebelt (2015). "Measuring heart rate variability in horses to investigate the autonomic nervous system activity – Pros and cons of different methods." Applied Animal Behaviour Science **166**: 1-10.

Suvas, S. (2017). "Role of Substance P Neuropeptide in Inflammation, Wound Healing, and Tissue Homeostasis." J Immunol **199**(5): 1543-1552.

Szabó, C., Z. Vizesi and A. Vincze (2021). "Heart Rate and Heart Rate Variability of Amateur Show Jumping Horses Competing on Different Levels." Animals **11**(3): 693.

Taintor, J., E. A. Sartin, B. M. Waldrige and J. Schumacher (2006). "Acute pancreatitis in a 3-day-old foal." Journal of veterinary internal medicine **20**(1): 210-212.

Topczewska, J., W. Krupa, Z. Sokolowicz and J. Lechowska (2021). "Does Experience Make Hucul Horses More Resistant to Stress? A Pilot Study." Animals (Basel) **11**(12).

Torcivia, C. and S. McDonnell (2021). "Equine Discomfort Ethogram." Animals (Basel) **11**(2).

Tschoner, T. and M. Feist (2022). "Substance P concentrations in the blood plasma and serum of adult cattle and calves during different painful procedures and conditions - a systematic review." BMC Vet Res **18**(1): 232.

Uldahl, M. and H. M. Clayton (2019). "Lesions associated with the use of bits,

nosebands, spurs and whips in Danish competition horses." Equine Vet J **51**(2): 154-162.

van Breda, E. (2006). "A nonnatural head-neck position (Rollkur) during training results in less acute stress in elite, trained, dressage horses." J Appl Anim Welf Sci **9**(1): 59-64.

Visser, E. K., M. M. F. Kuypers, J. S. M. Stam and B. Riedstra (2019). "Practice of Noseband Use and Intentions Towards Behavioural Change in Dutch Equestrians." Animals (Basel) **9**(12).

Visser, E. K., C. G. van Reenen, J. T. N. van der Werf, M. B. H. Schilder, J. H. Knaap, A. Barneveld and H. J. Blokhuis (2002). "Heart rate and heart rate variability during a novel object test and a handling test in young horses." Physiology & Behavior **76**(2): 289-296.

Visser, E. K., M. VanDierendonck, A. D. Ellis, C. Rijksen and C. G. Van Reenen (2009). "A comparison of sympathetic and conventional training methods on responses to initial horse training." Vet J **181**(1): 48-52.

Weller, D., S. Franklin, G. Shea, P. White, K. Fenner, B. Wilson, C. Wilkins and P. McGreevy (2020). "The Reported Use of Nosebands in Racing and Equestrian Pursuits." Animals (Basel) **10**(5).

Whitlock, B. K., E. A. Coffman, J. F. Coetzee and J. A. Daniel (2012). "Electroejaculation increased vocalization and plasma concentrations of cortisol and progesterone, but not substance P, in beef bulls." Theriogenology **78**(4): 737-746.

Yamout, S. Z., J. E. Nieto, J. Anderson, H. E. De Cock, N. Vapniarsky and M. Aleman (2012). "Pathological evidence of pancreatitis in 43 horses (1986-2011)." Equine Vet J Suppl(43): 45-50.

Zebisch, A., A. May, S. Reese and H. Gehlen (2014). "Effect of different head-neck positions on physical and psychological stress parameters in the ridden horse." J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) **98**(5): 901-907.

VIII. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Anna May für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung des Projekts, der Auswertung der Ergebnisse und der Anfertigung der Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem Dr. Frank Weber und Sandra Kirsch für die Unterstützung bei der Laborarbeit und der Auswertung der Laboregebnisse. Herrn Dr. Yury Zablotzki möchte ich sehr herzlich für die schnelle und kompetente Hilfe bei der Auswertung der statistischen Daten danken.

Ein weiterer Dank geht an das Haupt- und Landgestüt Schwaiganger, sowie Herrn Dr. Remler für die Bereitstellung der Pferde, sowie für die Unterstützung und das Ermöglichen einer reibungslosen Durchführung des Projekts.

Ein ganz besonderer Dank gilt zudem allen Helferinnen und Helfern, welche trotz teils widriger Witterungsbedingungen in Schwaiganger die praktische Durchführung des Projekts erst ermöglicht haben. Ein herzlicher Dank hierbei vor allem an Jana Wittenberg, Carina Haupt, Laura Piel, Nina Rittweg, Thilo Beck, Marius Hanser, Sophie Leitmaier, Nina Gruber, Kira Hirschberger, Antonie Hanslik sowie an die Rotationsstudentinnen Natalie, Rebecca, Katrin, Sarah und Christina.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei allen, die mich in den letzten Wochen vor der Abgabe unterstützt und trotz einiger Schwierigkeiten nicht im Stich gelassen oder aufgegeben haben, oder mir nicht absichtlich noch zusätzliche Steine in den Weg gelegt haben, hierbei vor allem bei meinen Kolleginnen und Kollegen der Pferdeklinik LMU München und besonders bei Vanessa Franzen und Anna May.