

Ermittlung eines zirkadianen Kortikosteronprofils beim weiblichen Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*)

von Theresa Hillebrecht

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

**Ermittlung eines zirkadianen Kortikosteronprofils beim
weiblichen Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*)**

**von Theresa Hillebrecht
aus Würzburg**

München 2024

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

Lehrstuhl für aviäre Medizin und Chirurgie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Rüdiger T. Korb

Angefertigt in der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische

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

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

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger T. Korbel

Korreferent/en: Prof. Dr. Sabine André

Univ.-Prof. Dr. Wolfram Petzl

Univ.-Prof. Dr. Michael H. Erhard

Priv.-Doz. Dr. Astrid C. C. Wehner-Fleischberger

Tag der Promotion: 6. Juli 2024

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden in folgender Publikation am
12.03.2024 veröffentlicht:

Theresa Hillebrecht, Rüdiger Korbel, Monika Rinder und Manfred Gahr

Circadian Corticosterone Profile in Laying Hens

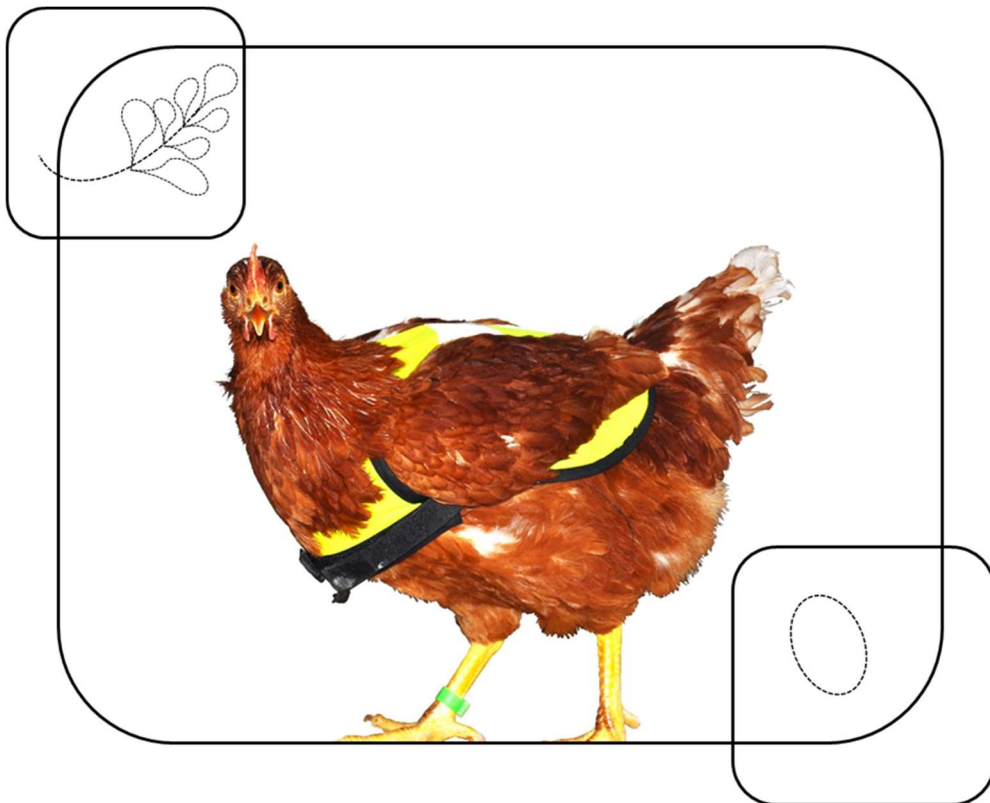
(*Gallus gallus domesticus*),

Animals 2024, 14(6), 873; <https://doi.org/10.3390/ani14060873>

Für meine Eltern und meinen Freund, die mich jederzeit unterstützt haben!

„All unsere Wissenschaft ist, gemessen an der Wirklichkeit, primitiv und kindlich - und doch ist sie unser kostbarstes Gut.“

(Albert Einstein)



I.	INHALTSVERZEICHNIS	VI
II.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
III.	EINLEITUNG	1
IV.	LITERATURÜBERSICHT	3
	IV.1 Definition und Messung von Stress.....	3
	IV.2 Die physiologische Bedeutung von Kortikosteron.....	5
	IV.3 Messmethoden für Kortikosteron.....	11
	IV.4 Abstammung, Zuchtlinie und Lebensweise der Legehennen.....	13
V.	PUBLIKATION	15
VI.	MATERIAL UND METHODEN	49
	VI.1 Tierexperimentelle Vorgehensweise.....	49
	VI.2 Versuchstiere, Haltung und Fütterung.....	49
	VI.3 Handhabung und Training.....	53
	VI.4 Versuchsaufbau.....	55
	VI.5 Durchführung.....	61
	VI.6 Laboranalytische Methoden.....	63
	VI.6.1 Vorbereitung der Plasmaproben.....	63
	VI.6.2 Extraktion der Plasmaproben.....	65
	VI.6.3 Ermittlung der Wiedergewinnungswerte.....	65
	VI.6.4 Radioimmunoassay.....	67
	VI.6.5 Trennung gebundener und freier Zählwerte (Spin-down).....	67
VII.	ERGEBNISSE	69
	VII.1 Ergebnisse Hormonmessung.....	69
	VII.2 Auswertung des Audio- und Videomaterials.....	73
	VII.3 Statistische Auswertung.....	77

VIII. DISKUSSION	81
VIII.1 Studiendesign.....	81
VIII.2 Einfluss der Narkose sowie der Probennahme auf Kortikosteron.....	83
VIII.3 Wechselwirkung von Verhalten und Kortikosteron.....	85
VIII.4 Wechselwirkung von Reproduktion und Kortikosteron.....	87
VIII.5 Einfluss der Photophase und der Jahreszeit auf Kortikosteron.....	89
VIII.6 Beeinflussung blutanalytischer Parameter durch Kortikosteron.....	93
VIII.7 Kortikosteron in der Stressbeurteilung.....	95
VIII.8 Ausblick.....	97
IX. ZUSAMMENFASSUNG	99
X. SUMMARY	101
XI. LITERATURVERZEICHNIS	103
XII. ANHANG	131
XIII. DANKSAGUNG	133

II. Abkürzungsverzeichnis:

Acetyl-CoA: Acetyl-Coenzym A

ACTH: Adrenocorticotropes Hormon, auch Adrenocorticotropin oder Corticotropin

BDNF: Brain-derived neurotrophic factor, Wachstumsfaktor

BMEL: Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft

cAMP: Cyclisches Adenosinmonophosphat

CBG: Corticosteroid-binding Globulin, auch Transcortin

CORT: Kortikosteron

CRH: Corticotropin-Releasing Hormon, auch Corticoliberin

ddH₂O: bidestilliertes Wasser

DOC: Desoxykortikosteron

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay

FSH: Follikel-stimulierendes Hormon, auch Follitropin

GCM: Glukokortikoidmetaboliten

GnRH: Gonadotropin-Releasing Hormon, auch Gonadoliberin

GR: Glukokortikoidrezeptoren

H:L - Verhältnis: Heterophile Granulozyten : Lymphozyten – Verhältnis

HVC: hohes Stimmzentrum (Hyperstriatum ventrale pars caudale)

i.m.: intramuskulär, in den Muskel appliziert

IRT: Infrarot-Thermographie

LB: Lohmann Brown (Legehybrid-Hühnerrasse)

L:D: Hell (L = Light) - Dunkel (D = Dark) - Zyklus

LC/MS: Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung

(Liquid Chromatography with Mass Spectrometry)

LH: Luteinisierendes Hormon, auch Lutropin

IMAN: lateraler magnozellularer Kern des vorderen Nidopalliums

MR: Mineralokortikoidrezeptoren

RA: robuster Kern des Arcopalliums

RIA: Radioimmunoassay

SHBG: Sexualhormon-bindendes Globulin

TierSchNutztV: Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung

WFM: Wide-Frequenzmodulation

III. Einleitung:

Die Klasse der Vögel (Aves) wird zoologisch den Sauropsiden zugeordnet und stellt mit über 10.000 rezenten Arten und der phylogenetischen Nähe zu den Sauriern als gemeinschaftliche Wurzel von Vögeln und Reptilien (Sauropsiden) seit jeher ein interessantes Forschungsgebiet dar. Dazu tragen neben den speziellen anatomischen Beschaffenheiten im Vergleich zu Säugern (Mammalia) auch ein ausgeprägtes Sozial- und Kommunikationsverhalten bei. Ein gutes Beispiel dafür stellt das Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*) dar, welches von dem Bankivahuhn (*Gallus gallus*) aus Süd- und Südostasien abstammt. Es besitzt eine hohe Intelligenz und innerhalb der Herde besteht eine klare Rang- und Hackordnung, die durch Rangordnungskämpfe festgelegt wird. In dieser Studie wurden Legehennen als Modelltiere verwendet, da sie sich vergleichsweise gut an Menschen und die für die Studie notwendige Handhabung gewöhnen können sowie in einer Kleingruppenhaltung erwartungsgemäß weniger Rang- und Hackordnungskämpfe zeigen als Hähne.

Im Jahr 2020 wurden über 173 Millionen Stück Wirtschaftsgeflügel in Deutschland gehalten (BMEL-Statistik 2024a). Mit über 159 Millionen Stück, was etwa 90 % entsprach, machten die Hühner den größten Anteil des Wirtschaftsgeflügels aus (BMEL-Statistik 2024a). Die Zahl der Legehennen betrug dabei im Jahr 2023 rund 50,3 Millionen Stück in Deutschland (BMEL-Statistik 2024a). Statistisch nicht erfasst sind die zusätzlich privat in Kleingruppen gehaltenen Hühner.

Bei den kommerziell gehaltenen Hühnern handelt es sich meist um Hybridzüchtungen, wobei häufig die Linien Lohmann Brown und Lohmann LSL-Classic in Deutschland gehalten werden. Der weltweit führende Züchter dieser Hybridlinien ist dabei die Lohmann Tierzucht GmbH mit Sitz in Cuxhaven. Laut Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung (TierSchNutzTV) muss für je neun Legehennen eine nutzbare Fläche von mindestens einem Quadratmeter zur Verfügung stehen, ohne dass die Mindestfläche von 2,5 Quadratmetern unterschritten wird (BfJ 2001). Rechnerisch bedeutet dies, dass auf jede Henne 0,11 Quadratmeter entfallen. Die hohe Belegdichte, die sich daraus ergibt, verursacht bei den Tieren jedoch häufig Stress.

Für eine Stressbeurteilung bei Tieren, welcher in der heutigen Zeit immer mehr Bedeutung zukommt, werden valide Daten benötigt. Die Zielsetzung dieser Dissertation war daher der Zugewinn von grundlagenorientierten Daten im Bereich der Endokrinologie von Vögeln, mit Fokus auf dem

Haushuhn. Im Detail thematisiert sie das Steroidhormon Kortikosteron (CORT), welches seit langer Zeit als Stress-Indikator herangezogen wird, jedoch in seiner Aussagekraft umstritten ist. Interaktionen der einzelnen Individuen können je nach Art und Dauer einen entscheidenden Einfluss auf die Höhe der CORT-Werte im Blut haben. Daher gilt es, externe Stressoren zu minimieren und den Einfluss der Interaktionen zu berücksichtigen bei der Untersuchung der Tagesrhythmik von CORT. Nach unserem Kenntnisstand gibt es bisher nur Studien zu CORT-Messungen an verschiedenen Individuen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Ralph et al. 2015; Weimer et al. 2018) oder Versuche, bei denen dieselben Tiere mehrmals beprobt wurden, aber entweder soziale Interaktionen innerhalb der Herde vernachlässigt wurden oder die Versuchstiere einzeln untergebracht waren (Johnson und van Tienhoven 1980; Johnson 1981; de Jong et al. 2001; Fallahsharoudi et al. 2015).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde bei 12 adulten Legehennen über einen Zeitraum von drei Tagen alle vier Stunden eine Blutprobe genommen zur Bestimmung der CORT-Konzentration durch ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Zur Beobachtung der sozialen Interaktionen wurden Audioaufnahmen mittels auf den Tieren befestigter Mikrofone und Videoaufnahmen mithilfe einer Überwachungskamera aufgezeichnet, welche im Anschluss an die Versuche ausgewertet wurden. Das gesamte Datenmaterial wurde final auf das Vorkommen einer zirkadianen Rhythmik überprüft.

Wir erwarteten einerseits eine tageszeitliche Änderung der CORT-Konzentrationen sowie andererseits bei Auftreten von agonistischem Verhalten in der Versuchstiergruppe einen stressabhängigen Anstieg der CORT-Konzentration im Blut in Korrelation zur Intensität des erlebten Stresses.

IV. Literaturübersicht:

IV.1 Definition und Messung von Stress

Stress ist eine physische und psychische Reaktion von Lebewesen auf bestimmte äußere Stressoren, um außergewöhnliche Situationen bewältigen zu können. Damit verbunden ist eine sowohl physische als auch psychische Belastung. Cannon (1915) beschrieb, dass die Emotion Angst mit der Flucht verbunden ist und Wut mit dem Instinkt zum Kämpfen oder Attackieren. Darauf aufbauend verfasste Seyle die Definition von Stress als „unspezifische Reaktion des Körpers auf jede an ihn gerichtete Forderung“ (1976). Eine spezifischere Definition formulierte Creel mit der Unterscheidung in Stressor und Stressreaktion (2001). Ein Stressor wurde als der Stimulus definiert, der eine physiologische Stressantwort auslöst, wie zum Beispiel einen Anstieg der Glukokortikoidsekretion (Creel 2001). Auch Cockrem (2007) erwähnte in seinen Arbeiten den Nachweis von Stress durch CORT-Messungen.

Reizanhäufungen können zu Stress führen, wobei zwischen Sustress, Eustress und Distress unterschieden werden muss (Lu et al. 2021). Definiert werden diese Begriffe von Lu et al. (2021) wie folgt: Sustress beschreibt einen Zustand der Homöostase, in dem Reize zu schwach sind, um einen Organismus herauszufordern. Eustress wird als positiver Stress definiert, der den Körper belastet, ihn aber befähigt, schwierige Aufgaben zu lösen. Im Gegensatz dazu bezeichnet Distress negativen Stress, der den Organismus in hohem Ausmaß fordert und eine starke Stressreaktion hervorrufen und somit die Gesundheit beeinträchtigen kann (Lu et al. 2021).

Ebenso wurde das Verhältnis der heterophilen Granulozyten zu den Lymphozyten (H:L) im Blut zum Nachweis von Stress herangezogen, jedoch ist diese Methode alleine nicht zuverlässig. In der Theorie soll der durch chronischen Stress erhöhte Glukokortikoidgehalt im Blut zu einer Lymphozytopenie und Heterophilie führen und somit das H:L - Verhältnis erhöhen. Doch atypische Hämozyten oder unentdeckte Bakteriämien können zu falschen Lymphozyten- und Granulozytenzahlen führen und somit das H:L - Verhältnis verfälschen (Cotter 2015). Daher wird das H:L - Verhältnis oft im Zusammenhang mit CORT-Messungen bestimmt (Weimer et al. 2018; Matur et al. 2015).

Als weitere Parameter können neben den zuvor genannten Stressindikatoren die Körperinnen- und Außentemperatur herangezogen werden. Durch akuten, intermittierenden oder chronischen Stress

kommt es zu einer peripheren Vasokonstriktion, was zu einer kurzfristigen Abkühlung der Körperoberfläche und zu einem Anstieg der Körperinnentemperatur führt (Herborn et al. 2018; Herborn et al. 2015). Die Oberflächentemperatur kann dabei an Kamm, Kehllappen, Gesicht oder Augen mittels Infrarot-Thermographie (IRT) gemessen werden.

Auch einige laboranalytische Parameter werden durch erhöhte CORT-Konzentrationen beeinflusst und können somit in Verbindung mit Verhaltensbeobachtung und/oder CORT-Bestimmung Aufschluss über einen möglichen Stresszustand des Tieres geben. Erhöhte Blutglukosewerte (Referenzbereich 227 – 300 mg/dL) können aufgrund einer gesteigerten Glukoneogenese sowie Glykogenolyse auftreten (Remage-Healey und Romero 2000; Brown et al. 2021; Carpenter und Marion 2018). Zudem sind erhöhte Blutkreatininwerte (Referenzbereich 0,9 – 1,8 mg/dL) möglich (Zaytsoff et al. 2019; Carpenter und Marion 2018). Änderungen im Lipidmetabolismus können des Weiteren zu einer Steatosis hepatitis führen und in erhöhten Gallensäurewerten resultieren (Cray et al. 2008; Hu et al. 2017; Hu et al. 2018; Zaytsoff et al. 2019).

IV.2 Die physiologische Bedeutung von Kortikosteron

Bei CORT handelt es sich um ein Steroidhormon bei den Vögeln, welches in der Nebennierenrinde synthetisiert und durch komplexe Regelkreise gesteuert wird. CORT beeinflusst verschiedene physiologische Funktionen im Organismus, darunter den Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsel, das Harnsystem und das Immunsystem (Sapolsky et al. 2000; Schmidt und Soma 2008).

Als oberstes Steuerelement für alle vegetativen und endokrinen Vorgänge fungiert der Hypothalamus, ein Teil des Dienzephalons. Die Freisetzung von Glukokortikoiden wird durch endokrinologische Regelkreise gesteuert, wobei der Hypothalamus an erster Stelle steht.

Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA- bzw. HHN-Achse) stellt einen komplexen Regelkreis zwischen Hypothalamus, Hypophyse und der Nebennierenrinde dar und beruht auf dem Mechanismus einer negativen Rückkopplung. Das im Hypothalamus gebildete Neurohormon Corticotropin-Releasing Hormon (CRH) wirkt stimulierend auf den Hypophysenvorderlappen, indem es dort durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A aktiviert wird und somit die Synthese von Proopiomelanocortin (POMC) anregt. Prohormon-Konvertasen bilden anschließend aus POMC das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH). Das Peptidhormon ACTH regt seinerseits in der Nebennierenrinde die Bildung von Kortikoiden aus dem Lipid Cholesterol an. Cholesterol wird mit der Nahrung aufgenommen oder in der Leber aus dem Thioester Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) synthetisiert. Der Mechanismus der negativen Rückkopplung erfolgt durch die Glukokortikoide selbst, indem im Hypothalamus die Ausschüttung von CRH und in der Hypophyse die Freisetzung von ACTH gehemmt wird (Vandenborne et al. 2005; Carsia et al. 1988).

Zu den Kortikoiden zählen sowohl die Mineralokortikoide als auch die Glukokortikoide, wobei die Hauptvertreter der aviären Glukokortikoide CORT und Cortisol sind (Deviche et al. 2017). CORT übt seine Wirkung über Glukokortikoidrezeptoren (GR), die auch als NR3C1 (Kernrezeptor-Unterfamilie 3, Gruppe C, Mitglied 1) bekannt sind, und Mineralokortikoidrezeptoren (MR), bekannt als NR3C2 (Kernrezeptor-Unterfamilie 3, Gruppe C, Mitglied 2), aus. GR kommen nahezu generalisiert im Körper von Vögeln vor (Wada und Breuner 2010; Lattin et al. 2012), während MR mit einer höheren Affinität zu CORT, aber geringerer Kapazität als GR, hauptsächlich im Gehirn, in der Niere, der Leber und in den Hoden sowie in geringerer Konzentration in anderen Geweben lokalisiert sind (Breuner et al. 2003;

Funder 2005; Lattin et al. 2012). Bei Säugetieren ist bekannt, dass GR Glukokortikoide mit einer viel geringeren Affinität binden als MR bei basalen Glukokortikoidkonzentrationen. Dies weist darauf hin, dass GR an der Regulierung der HPA-Achse bei stressbedingt erhöhten Glukokortikoidspiegeln beteiligt sind (Reul und Kloet 1985).

Glukokortikoide haben zahlreiche wichtige Funktionen im Organismus. Sie zeigen eine katabole Wirkung auf Proteine und erhöhen die Glukoneogenese aus Aminosäuren sowie die Glykogenolyse in der Leber, wodurch es zu einer Erhöhung der Glukosekonzentration im Blut kommt (Brown et al. 2021). Die Fettsäuresynthese in der Leber wird gesteigert (Scanes 2016). Aufgrund einer verringerten Proteinbiosynthese als Folge erhöhter CORT-Werte kommt es wegen einer geringeren Antikörperproduktion und der Unterdrückung der zellulären Abwehr zu einer Immunsuppression (Sapolsky et al. 2000; Schmidt und Soma 2008).

CORT scheint einen photoperiodisch bedingten, zirkadianen Rhythmus und eine Zunahme zum Zeitpunkt der Eiablage zu zeigen (Johnson 2015). Viele Vogelarten, darunter verschiedene tropische und nicht-tropische Sperlingsvögel, der Gemeine Star (*Sturnus vulgaris*), das Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*) oder der Nazca-Tölpel (*Sula granti*), haben bei Untersuchungen der Tagesrhythmik nachts höhere CORT-Werte als am Tag gezeigt (Etches 1979; Breuner et al. 1999; Romero und Remage-Healey 2000; Rich und Romero 2001; Tarlow et al. 2003; Schwabl et al. 2016). Weitere unregelmäßige Erhöhungen des basalen Blut-CORT-Spiegels während der Photoperiode könnten auf exogenen Stress bei diesen Vogelarten hinweisen. Abweichend davon zeigte eine Studie bei juvenilen weiblichen Broilern der Hybridrasse Hybro G in einem Alter von fünf Wochen unter acht Stunden Licht (ab 07:00 Uhr) und 16 Stunden Dunkelheit (8L:16D, Hell (L = Light) - Dunkel (D = Dark) - Zyklus) sowie in Einzelkäfighaltung am Tag einen CORT-Peak um 11:00 Uhr (de Jong et al. 2001). Truthennen (*Meleagris gallopavo*) wiesen unter einem 14L:10D - Lichtregime einen zirkadianen Rhythmus auf mit dem höchsten CORT-Peak (7140 pg/ml) in der Mitte der Photophase (11:00 Uhr) und einem zweiten kleineren Peak (4110 pg/ml) während der Scotophase (22:00 Uhr) (Proudman 1991). Bei Säugetieren wie beispielsweise Ratten scheint die Steuerung der zirkadianen CORT-Rhythmik über eine Änderung der adrenalen Sensitivität für ACTH durch Melatonin-unabhängige Mechanismen stattzufinden und somit die zirkadiane Rhythmik von CORT zu regulieren, es trat jedoch keine positive Korrelation der

ACTH- und CORT-Level auf (Otsuka et al. 2012). Kurze Tageslängen (8L:16D) verstärkten die Tagesrhythmik von CORT im Vergleich zu einer längeren Tagesdauer (16L:8D). Injektionen von Melatonin konnten bei einer Haltung der Ratten unter einer langen Tageslichtdauer (16L:8D) keine CORT-Rhythmik wie unter kurzen Tageslichtlängen (8L:16D) induzieren (Otsuka et al. 2012). Bisherige Studien weisen auf eine Beteiligung des Nucleus suprachiasmaticus (SCN) im Hypothalamus hin (Kalsbeek et al. 2012; Engeland und Arnhold 2005). Bei Vögeln erfolgt die Steuerung hormoneller Tagesrhythmen jedoch durch ein komplexes Zusammenspiel der Retina, Epiphyse und des Hypothalamus inklusive des SCN (Chong et al. 2003; Gwinner und Brandstätter 2001; Underwood et al. 2001; Cassone und Menaker 1984; Zeman und Herichová 2011; Yang et al. 2022b). Beteiligt daran sind die sogenannten Uhren-Gene (clock genes) CLOCK, BMAL1, CRY1, CRY2, PER2 sowie PER3 (Yang et al. 2022b). CRH ist eng verbunden mit den Uhren-Genen und somit direkt an der Steuerung zirkadianer Rhythmen beteiligt. Chronischer Stress kann zu einer verminderten CRH-Sekretion führen und somit eine Störung der Tagesrhythmik verursachen (Yang et al. 2022b). In Stresssituationen wird CORT aufgrund einer erhöhten Sekretion von ACTH zunehmend freigesetzt (Angelier et al. 2009; Soleimani et al. 2011). Es wurde beschrieben, dass der Basal-CORT-Spiegel nach der Exposition gegenüber einem Stressor schnell ansteigt. Der Anstieg erfolgt nach 45 Sekunden bis 3 Minuten (Beuving und Vonder 1978; Wingfield et al. 1982). CORT wiederum stimuliert die Synthese von Epinephrin (Adrenalin), welches zusammen mit CORT eine Stressreaktion im Körper auslösen kann (Carsia 2015). Es gibt Hinweise darauf, dass das Ausmaß der basalen und stressbedingten CORT-Ausschüttung bis zu einem gewissen Grad genetisch bestimmt ist (Béziers et al. 2019). Für kurzfristigen Stress wurden gegenteilige Effekte beschrieben, sowohl steigende als auch sinkende CORT-Konzentrationen (Heiblum et al. 2000; Deviche et al. 2010; Deviche et al. 2012; Abolins-Abols et al. 2018).

Es wird angenommen, dass Langzeitstress die Blut-CORT-Konzentration erhöht, welche ihrerseits Auswirkungen auf die Sexualsteroidhormone und Prolaktin (PRL) aus dem Hypophysenvorderlappen zeigt und somit die Reproduktion und die parentale Fürsorge beeinflussen kann (Astheimer et al. 1992; Sharp et al. 1998; Tsipoura et al. 1999; Jiang et al. 2005; Angelier et al. 2009; Ouyang et al. 2011; Crossin et al. 2012; Dickens et al. 2012; Elfving et al. 2015; Yan et al. 2019). PRL spielt zu Beginn und

zur Aufrechterhaltung der Brutphase eine wichtige Rolle im Reproduktionszyklus (Sharp et al. 1998; Jiang et al. 2005). Erhöhte PRL-Werte treten saisonal aufgrund von Photoperiodismus oder während der Brutphase auf (Sharp et al. 1998). Eine durch Stress verursachte CORT-Freisetzung kann das parentale Verhalten von Vögeln negativ beeinflussen (Angelier et al. 2009; Ouyang et al. 2011), nicht jedoch eine alleinige Verringerung der PRL-Werte ohne CORT-Freisetzung, so die Ergebnisse einer Studie bei brütenden, männlichen Adélie-Pinguinen (*Pygoscelis adeliae*) (Thierry et al. 2013). Bei der Untersuchung des parentalen Verhaltens wurde jedoch keine direkte Korrelation zwischen den Hormonen PRL und CORT gefunden (Angelier et al. 2013). Aber auch für chronischen Stress wurden gegenteilige Effekte mit einer Verringerung der basalen CORT-Konzentration und einer reduzierten Reaktion auf akute Stresssituationen beschrieben, vermutlich durch Herunterregulierung der HPA-Aktivität (Rich und Romero 2005). Es wird berichtet, dass dauerhaft erhöhte CORT-Spiegel im Blut die LH-Sekretion hemmen können, was wiederum zu niedrigeren Sexualsteroidkonzentrationen wie beispielsweise von Testosteron führt und somit die weitere Eibildung und Eiablage beeinträchtigt (Connolly und Callard 1987; Goutte et al. 2010).

Die Rolle von CORT in der Reproduktion ist bisher nicht eindeutig definiert. Einerseits gibt es Studien die darauf hinweisen, dass CORT das Brutverhalten zugunsten der Nahrungssuche negativ beeinflusst (Astheimer et al. 1992; Tsioura et al. 1999). Andere Studien zeigen, dass erhöhte Plasma-CORT-Spiegel zu einer gesteigerten Nahrungssuche bei den Eltern und infolgedessen zu einem erhöhten Körpergewicht bei den Küken führen, was einen Fitnessvorteil bedeutet (Crossin et al. 2012). Mehrere Studien stimmen jedoch mit einer erhöhten Futteraufnahme und einem gesteigerten Futtersuchverhalten bei Vögeln mit hohen CORT-Werten überein (Nasir et al. 1999; Koch et al. 2002; Crossin et al. 2012). Trotz gesteigertem Futtersuchverhalten scheinen basale CORT-Spiegel oder eine exogene CORT-Verabreichung negativ mit der Körpermasse und der Körperfitness zu korrelieren (Breuner und Hahn 2003; Love et al. 2005; Dong et al. 2007; Yuan et al. 2008; Wada et al. 2009). Einige Wildvogelarten zeigen im Zusammenhang mit der Brutzeit erhöhte CORT-Werte, beispielsweise der Gemeine Star (*Sturnus vulgaris*) und der Weißkronenspatz (*Zonotrichia leucophrys*) im Zusammenhang mit der Eiablage oder der Trauerschnäpper (*Ficedula hypoleuca*) während der Brutphase (Johnson 2015). Andere Arten wie die Kanadagans (*Branta canadensis*) zeigen während

der Brutzeit kaum Veränderungen der CORT-Werte oder sogar eine Abnahme des Plasma-CORT (Johnson 2015). Die Werte für freies CORT aus dem Blutplasma sind jedoch nicht immer signifikant, da die Bindungsfähigkeit des Transcortins (syn. Corticosteroid-binding Globulin – CBG) je nach Jahreszeit variieren kann (Breuner et al. 2003).

Die Rolle von CORT in den Ovarien und bei der Ovulation ist unklar, da sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Effekte beschrieben wurden. Eine zeitliche Regulation der präovulatorischen LH (Luteinisierendes Hormon) - Sekretion durch CORT konnte nicht nachgewiesen werden, da das zirkulierende Plasma-CORT vor dem Eisprung nicht anstieg (Johnson 2015). Injektionen mit CORT, Desoxykortikosteron (DOC) oder ACTH können zwar eine vorzeitige Ovulation auslösen, aber es ist unwahrscheinlich, dass diese Hormone die Freisetzung von LH im Hypothalamus und/oder in der Hypophyse direkt regulieren (Johnson 2015). Jedoch scheint der Vorgang der Eiablage selbst eine Rolle bei der Erhöhung von CORT zu spielen, und es wird vermutet, dass die Östrogene, Progesteron und das LH mit seinem Höhepunkt ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf den Anstieg des CORT nach der Eiablage haben (Beuving und Vonder 1981; Buntin 1996; Silver et al. 1974; Sockman und Schwabl 1999). Der LH-Peak sowie die Wirkung von Mesotocin und Arginin-Vasotocin fördern Muskelkontraktionen im Ovidukt, die für die Eiablage erforderlich sind (Takahashi und Kawashima 2008). Überdies zeigte eine Studie mit Japanwachteln (*Coturnix japonica*), dass langfristig erhöhte CORT-Konzentrationen die Fertilitätsrate senken können (Dickens et al. 2012) und aggressives Paarungsverhalten männlicher Japanwachteln erhöhte das CORT-Niveau verpaarter weiblicher Tiere (Persaud und Galef, Jr. 2005; Dickens et al. 2012). Doch der Phänotyp der männlichen japanischen Wachtel scheint für die Weibchen auch subtil wahrnehmbar zu sein und beeinflusst ebenfalls deren CORT-Konzentrationen (Correa et al. 2011).

Ferner steht der Vogelgesang, ein erlerntes Verhalten, um Gebiete zu verteidigen und potenzielle Brutpartner anzulocken, im Zusammenhang mit CORT (Madison et al. 2015; de Kort et al. 2009). Das Singen basiert auf komplexen Mechanismen miteinander verbundener Gehirnregionen und endokriner Prozesse. Während der Brutzeit von Frühling bis Sommer weisen einige der am Singen beteiligten Kernregionen wie das hohe Stimmzentrum (HVC, Hyperstriatum ventrale pars caudale), der robuste Kern des Arcopalliums (RA) und der Bereich X (aviäre Basalganglien mit striatalen und pallidalen

Neuronen) eine Volumenzunahme auf (Tramontin und Brenowitz 2000). Bei männlichen Singammern (*Melospiza melodia*) wurde festgestellt, dass die Volumenzunahme in dem HVC auf eine Vergrößerung vorhandener Neuronen und eine steigende Neuronenzahl zurückzuführen ist, im RA jedoch nur auf eine Vergrößerung vorhandener Neuronen sowie auf die Verbreiterung des Abstands zwischen den einzelnen Neuronen (Smith et al. 1997). Andere Bereiche, wie der laterale magnozellige Kern des vorderen Nidopalliums (IMAN), verändern ihr Volumen nicht. Der Grund für diese Änderungen ist die zunehmende Länge der Tage und die damit verbundene Verlängerung der Photophase. Es gibt eine Hypothese, dass das saisonale Wachstum von RA und Bereich X eine transsynaptische Unterstützung durch das HVC erfordert. Die mögliche Funktion des Wachstumsfaktors BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) als Botenstoff des HVC wird diskutiert (Tramontin und Brenowitz 2000; Wissman und Brenowitz 2009). Neben der Dauer der Photoperiode haben auch das Sexualsteroid Testosteron und seine Metaboliten einen entscheidenden Einfluss auf das Gesangsverhalten von Vögeln. Erhöhte Spiegel von Sexualsteroiden scheinen die Bildung von RA-bildenden Neuronen und Interneuronen zu verringern und die Lebensdauer von HVC-Neuronen zu verlängern (Rasika et al. 1994; Tramontin und Brenowitz 2000). CORT hingegen reduziert das Volumen des HVC und die Anzahl von NeuN + - Zellen (Biomarker für Neuronen) und BrdU + - Zellen (Marker für proliferierende Zellen) (Newman et al. 2010). Der RA, der Bereich X, der Hippocampus und das Volumen des Telencephalons werden von CORT nicht beeinflusst. Die orale Verabreichung von CORT an juvenile Zebrafinken (*Taeniopygia guttata*) in einem Experiment führte zu einem physiologischen Zustand wie nach Exposition gegenüber einem akuten Stressor (Boogert et al. 2018). Die Jungvögel, die aufgrund der CORT-Aufnahme eine weniger starke Bindung zu ihren Vätern hatten, kopierten das Gesangsmuster der Väter seltener. Dies könnte auf eine selbstbestimmte Wahl des Gesangsmodells durch die Jungvögel oder auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass die Väter die vermeintlich schwächeren Jungvögel anders behandelten als die unbehandelten Kontrollvögel.

Weitere durch CORT beeinflusste Aspekte sind räumliches Lernen, die lokomotorische Aktivität und die Migration bei einigen Vogelarten wie beispielsweise dem Steinschmätzer (*Oenanthe oenanthe*) (Breuner et al. 1998; Hodgson et al. 2007; Cornelius et al. 2013; Eikenaar et al. 2017). Während der Migration müssen wiederholt Stopps eingelegt werden, um die Energiereserven aufzufüllen. Die

basalen CORT-Werte stiegen bei den Steinschmätzern mit zunehmender Migrationsdauer und mit Windunterstützung in Richtung des Migrationsziels (Eikenaar et al. 2017). Steinschmätzer mit hohen CORT-Werten setzten die Migration eher in einer geeigneten Nacht fort und begannen ihren Flug früher in der Nacht (Eikenaar et al. 2017).

IV.3 Messmethoden für Kortikosteron

CORT kann sowohl im Blut als auch in Federn oder Exkreten wie Harnsäure, Faeces oder Sputum gemessen werden (Weimer et al. 2018). Federn akkumulieren Glukokortikoide während ihres Wachstums über einen langen Zeitraum und eignen sich somit eher für den Nachweis von langfristig erhöhten Plasma-Glukokortikoidkonzentrationen (Bilková et al. 2019). Vorteilhaft bei der CORT-Messung aus Federn ist, dass diese hitze- und kältebeständig sind und sich somit gut lagern lassen. Die Analyse von Blutproben spiegelt an den Zeitpunkt der Blutentnahme gebundene Hormonkonzentrationen der Vögel wider und ermöglicht somit keine Verlaufsuntersuchung über einen längeren Zeitraum. Daher müssen mehrere Proben gesammelt werden, um einen tageszeitlichen Verlauf erkennen zu können. Es gibt Daten die darauf hinweisen, dass die Verwendung eines Venenverweilkatheters in der Flügelvene (Vena ulnaris) Schwankungen bei der Hormonmessung reduzieren kann, wohingegen eine Blutprobennahme mittels Venen- oder Herzpunktion durch Blutungen zu einer Erhöhung der CORT-Konzentrationen führen kann (Johnson 1981).

Als sehr präzise, quantitative Messmethode für Glukokortikoidhormone aus Blut, Federn, Faeces, Urin oder Auswurf eignen sich sowohl das Radioimmunoassay (RIA) als auch die Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC/MS) (Weimer et al. 2018; Carvalho et al. 2018; Goymann 2012; Rönquist-Nii und Edlund 2005; Viljoen et al. 2019). Alternativ ist eine Bestimmung mit ELISA-Kits möglich, wobei unter diesen nicht alle zur Messung von aviärem CORT geeignet und validiert sind (Häffelin et al. 2021).

IV.4 Abstammung, Zuchtlinie und Lebensweise der Legehennen

Das Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*) gehört zoologisch zur Familie der Fasanenartigen (*Phasianidae*) und lässt sich somit der Ordnung der Hühnervögel (*Galliformes*) zuordnen. Es stammt von dem wildlebenden Bankivahuhn (*Gallus gallus*) ab, welches sein natürliches Habitat in Süd- und Südostasien hat. Die Domestikation des Bankivahuhns erfolgte schon sehr früh in der menschlichen Geschichte, vor fast 8.000 Jahren. Überreste domestizierter Hühner aus 16 Stätten am Gelben Fluss in Nordostchina, die aus der Zeit des Neolithikums (Jungsteinzeit) stammen, wurden auf ein Alter von mindestens 7.500 Jahren datiert (Fumihito et al. 1994). Die ersten Funde aus Mitteleuropa stammen aus der frühen Eisenzeit ab etwa 800 bis 750 v. Chr.. Fundort war die Heuneburg, eine Höhensiedlung bei Hundersingen in Baden-Württemberg (Boessneck 1958).

In der heutigen Zeit ist der Anteil des als Haustier gehaltenen Zier- und Rassegeflügels, darunter auch Haushühner, deutlich angestiegen, wenngleich die meisten Hühnervögel in Deutschland als landwirtschaftliche Nutztiere für die Fleisch- und Eiergewinnung aufgezogen und gehalten werden (BMEL-Statistik 2024a, 2024b, 2024c; Ulmer 2023).

Bei den kommerziell in der Landwirtschaft genutzten Hühnern handelt es sich zumeist um Hybridlinien, deren Zucht nach dem zweiten Weltkrieg begann. Man unterscheidet dabei zwischen Mast- und Legehybriden. Seltener werden Zweinutzungsrasen eingesetzt, oftmals in der ökologischen Landwirtschaft. Die Bezeichnung als Hybridhuhn ist hierbei irreführend, da es sich nicht um echte Hybriden, sondern vielmehr um Gebrauchskreuzungen handelt. Bei den Legehybriden kommt unter anderem die Linie Lohmann Brown (LB) zum Einsatz, welche auch für diese Studie genutzt wurde. Sie wurde 1984 von der Lohmann Tierzucht GmbH aus Cuxhaven gezüchtet und auf dem Markt eingeführt, welche zur EW Group GmbH gehört. Eine LB Classic Henne wird durchschnittlich 1,8 bis 2,1 kg schwer und legt bis zu 320 Eier pro Jahr (LOHMANN Deutschland GmbH & Co. KG 2024).

Legehennen sind so wie alle Hühnervögel soziale und intelligente Tiere, die in Gruppen eine feste Rang-/Hackordnung ausbilden, welche durch Rangkämpfe festgelegt und durch Dominanzverhalten aufrechterhalten wird. In der Natur leben die Bankivahühner in Kleingruppen von bis zu 20 Tieren zusammen, während die Hühner in kommerzieller Haltung in großen Betrieben mit oft mehr als 200.000 Tieren gehalten werden (Javed und Rahmani 2000). Die in der TierSchNutzV (2021) Abschnitt 3

vorgeschriebenen Haltungsbedingungen erfüllen nur die Mindestanforderungen für eine Legehennenhaltung und können in großen Betrieben eine artgerechte Haltung kaum gewährleisten. Die Besatzdichte und andere Faktoren wie Luftqualität, Beleuchtung, Fütterung und Enrichment haben einen entscheidenden Einfluss darauf, ob die Tiere ihr natürliches (Sozial-) Verhalten ausleben können (Chen et al. 2019). Eine Störung dieser Faktoren kann in Distress und Frustration resultieren, woraufhin sich häufig Verhaltensstörungen wie Federpicken und Kannibalismus entwickeln (El-Lethey et al. 2000).

V. Publikation:

Die folgende Publikation wurde am 12.03.2024 in der Zeitschrift *Animals* veröffentlicht (*Animals* 2024, 14(6), 873; <https://doi.org/10.3390/ani14060873>).



Article

Circadian Corticosterone Profile in Laying Hens (*Gallus gallus domesticus*)

Theresa Hillebrecht ^{1,2,*} , Rüdiger Korbel ¹, Monika Rinder ¹  and Manfred Gahr ²

¹ Clinic for Birds, Small Mammals, Reptiles and Ornamental Fish, Ludwig-Maximilians-Universität München, 85764 Oberschleißheim, Germany; vorstandsassistenz@vogelklinik.vetmed.uni-muenchen.de (R.K.); monika.rinder@lmu.de (M.R.)

² Max Planck Institute for Biological Intelligence, 82319 Starnberg, Germany; communications@bi.mpg.de

* Correspondence: theresa.hillebrecht@vogelklinik.vetmed.uni-muenchen.de

Simple Summary: Blood corticosterone concentrations are frequently used to evaluate stress responses in birds. Therefore, knowledge about physiological concentrations and daily fluctuations of this “stress hormone” is necessary. Corticosterone fluctuations in socially acting chickens are largely unknown, and we aimed to verify the presence of a daily rhythm. Therefore, blood samples were taken at intervals of four hours via a vein catheter over a period of three days from a total of 12 laying hens housed in groups of four in an enriched environment while video and audio recording their social interactions. Prior to the experimental phase, all hens were medically trained via adaptation to repeated handling to reduce their stress reaction. In most hens, corticosterone showed a circadian course with two elevations per day. Statistical analysis revealed a significant peak during daytime (between 12:00 p.m. and 04:00 p.m.), and a tendency for a second peak during the night (12:00 a.m.). Further studies are necessary to elucidate the underlying control mechanisms, light and seasonal influences as well the function of the nightly corticosterone peak.

Abstract: Measurement of blood corticosterone concentrations has been established as an indicator for assessment of acute distress. Therefore, knowledge on physiological fluctuations is required, but previous studies allow little conclusion on daily fluctuations in domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*). To verify the presence of a circadian corticosterone rhythm in socialized chickens, blood samples were taken at four-hour intervals from 12 laying hens kept in groups of four over three days, each. Prior to experiments, hens were adapted to repeated handling for stress reduction. Corticosterone concentration was determined using radioimmunoassay. Blood sampling time and duration were recorded, and audio and video recordings were analyzed to assess the impact of behavior on corticosterone concentrations. Despite individual fluctuations, most hens showed a circadian course with two peaks per day. Statistics revealed a significant peak during the day (between 12:00 p.m. and 04:00 p.m.) and a tendency for a second peak at night (12:00 a.m.). The daily corticosterone peak was not explained by daytime social stress and needs to be seen as an endophenotype. The role of nightly corticosterone production has to be investigated in further studies. There might be a relation between corticosterone and reproduction since the only hen not showing peaks was not laying eggs.

Keywords: circadian; chickens; corticosterone; physiology; chicken social interactions



Citation: Hillebrecht, T.; Korbel, R.; Rinder, M.; Gahr, M. Circadian Corticosterone Profile in Laying Hens (*Gallus gallus domesticus*). *Animals* **2024**, *14*, 873. <https://doi.org/10.3390/ani14060873>

Academic Editors: Jeffrey Downing and Colin G Scanes

Received: 24 January 2024

Revised: 7 March 2024

Accepted: 11 March 2024

Published: 12 March 2024



Copyright: © 2024 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/>).

1. Introduction

In birds, corticosterone (CORT) is the primary glucocorticoid besides cortisol, which is secreted in much lower concentrations [1]. CORT has been addressed in several studies as the relevant hormone for the detection of acute and chronic stress in birds [2–7], which requires knowledge on physiological homeostasis and on indicators useful for stress response diagnostics. Exposure to stimuli may result in a threat to homeostasis, called

stress, whereby a differentiation must be made between sustress, eustress and distress [8]. Sustress, also called inadequate stress, describes a state of homeostasis in which stimuli are too weak to challenge an organism. Eustress has been defined as positive stress which puts a strain on the body but enables it to solve difficult tasks. In contrast, distress describes negative stress which challenges the organism in the strongest way with high levels of stressors. Distress is able to cause a severe stress response and affect health [8]. Distress may translate into patterns of behavior that are not always recognized by owners [9–12]. In the chicken, this might include obvious signs such as beak breathing, polypnea and aggressive behavior towards people and/or conspecifics but also behavioral patterns such as feather plucking at flock members [9–12].

Physiologically, CORT influences various functions in the organism, including carbohydrate, lipid and protein metabolism, the urinary system and the immune system [7,13,14]. In addition, CORT shows an increase at the time of oviposition, although the underlying mechanisms are not yet fully understood [15].

Blood CORT may fluctuate dependent on environmental and endocrine stimuli over time, leading to individual variations. It reflects current fluctuations in the blood with a change in hormone concentrations about 45 s to three minutes after exposure to an acute stressor [16–18]. Seasonal conditions such as daylength, brightness, temperature, humidity or reproduction state as well as other external factors like stocking density, suboptimal housing conditions, inappropriate handling/transport and social interactions have a clear impact on animals' condition [19]. Furthermore, individuals may vary in their susceptibility to stressors due to escape-reflex-oriented behavior or due to individual physiology as well as the amount of corticosteroid binding globulin (CBG) in the blood [20–25]. When determining plasma CORT using available assays, it is important to consider that the measures do not reflect unbound, biologically active CORT but show total CORT concentrations which depend in part on seasonal and age-dependent fluctuations in the CBG's binding affinity [20,22].

Repeated measurements of hormone concentrations in the same individual during a day, which are essential for behavioral and endocrine studies to establish a reliable hormone profile, are very rarely performed. In the rare attempts for circadian CORT profiles, different individual chickens were sampled at different times, each, [26,27] or in experiments in which the same animals were sampled several times, social interactions within a flock were not considered or the animals were kept individually [28–32].

We therefore aimed to describe a profile of CORT concentrations over a course of several days in domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*) kept in small groups. Since we expected that exposure to unexpected stressors and social interactions, especially aggressive behavior, could influence the CORT values, we recorded and analyzed behavior and sounds of the chicken during the complete experimental procedure.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Experimental Procedure

The present study was planned as a feasibility study to keep the number of animals required as low as possible in line with the 3R principle (Replacement, Reduction, Refinement) [33,34]. The experiments were conducted in accordance with the German animal welfare regulations and under permission of the German authorities (reference number ROB 55.2-2532.Vet_02-20-161).

Commercially reared Lohmann Brown classic laying hens ($n = 12$), aged 26–30 weeks at a minimum body weight of 1.5 kg, were used. Out of 12 hens, 11 reached sexual maturity prior the experimental phase. Only hen ten did not reach sexual maturity until the end of the experiments which was indicated by the first oviposition about two weeks after the experimental phase (eggs differed in size and color). All animals were clinically and parasitologically monitored by veterinarians. Only clinically healthy animals were used for the experiments. They were kept in groups of four in 11.21 m² aviaries filled with straw pellet litter and enriched according to German (TierSchNutzV, Section 3, §§ 13, 13a) and

European legislation (Directive 1999/74/EG; Directive 2010/63/EU) [35,36] for poultry and experimental animals and received water and feed (layer feed Legemehl Premium and mixed grain feed Vogelkörner Premium, Mifuma, Mannheim, Germany) ad libitum. Stocking density was 0.36 hens/m², and the aviaries used provided an enriched environment like small backyard poultry husbandries. Protection from infectious diseases was achieved by negative pressure ventilation, access restriction and hygiene sluices. A pecking stone (Pickblock, Crystalx Products, Münster, Germany), alfalfa hay bales (Compact Luzerne, Hartog, Lambertschaag, The Netherlands) and fresh fruits or vegetables were offered as enrichment on a daily basis. The hens were exposed to the natural daylight due to UV-transmitting windows considering avian specific UV-perception. The experiments were conducted successively, resulting in different light regimes (light–darkness) of 15L:9D (July, group one), 14L:10D (August, group two) and 11L:13D (September/October, group three). Temperature and relative humidity averaged 22.6 °C and 52%, respectively, during experiments.

Daily care, training and the whole experimental procedure were performed by the same person. Prior to the experimental phase, all hens were trained on a daily basis with rewards like mealworms, corn or grain mix to get used to being handled and to wear High-Visual chicken jackets (Yellow High-Vis Chicken Jacket, Omlet Ltd., Banbury, England) for at least two weeks [37,38]. Handling in the pre-experimental phase included repeated catching and holding the hens in the arm until beak breathing, polypnea or kicking as a sign of distress did not occur anymore. Adaptation to handling rapidly set in within approximately two weeks. After no distress associated behavior as described above during handling was displayed anymore, training with High-Visual chicken jackets was started. Depending on the individual behavior, the time to wear a jacket was slowly increased up to 5 h, starting with a minimum of two min. Mock bleeding was not performed in the training phase. Experimental procedure was started when all hens displayed normal behavior while wearing the High-Visual chicken jackets, assuming an adaptation to experimental setting, and thus, non-elevated CORT concentrations [38].

A total of six test series with three groups of four hens were performed. In each test series, two hens of a group were blood sampled every four hours over a period of three days via venous catheter (Vasofix Braunüle 22 G, 25 mm, blue, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany), minimizing the time between the catch of the individuals as much as possible because all samplings were performed successively. The experiment started at day one at 10:00 a.m. with insertion of venous catheter in order to reduce the length of catheterization and to lower the risk of potential medical complications (e.g., traumatization of the venous endothelium), followed by the first of 18 samplings at 12:00 p.m. at day one, and taken until day four at 09:00 a.m. which depicted a period of three days (71 h) (Table 1). Venous catheters were inserted into the ulnar vein under isoflurane inhalation anesthesia (5 Vol. % isoflurane for induction and 2.5 Vol. % isoflurane for maintenance) with preemptive analgesia using 0.5 mg/kg meloxicam (Metacam® 5 mg/mL solution for injection in dogs and cats, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Germany) i. m. 0.5 h pre surgery. A 3% citrate buffer solution was used as anticoagulant and blocking solution for the catheter. The catheter was closed with an obturator (obturator for Vasofix, G 22 × 25 mm, blue, B. Braun Melsungen AG).

For the next test series, the remaining untested two hens of the same group were used. This procedure was used for the other two groups until all 12 hens were sampled 18 times (Supplementary Material Table S1). A blood volume of 0.5 to 0.8 mL was taken during each drawing resulting in a total volume of up to a maximum of 14 mL for each hen during the sampling period (<1% of body weight).

In order not to disturb the hens more than necessary during the experimental phase, the aviary was only entered for blood sampling or feeding. When entering the aviary, the laying nests with inserts of synthetic turf (polyethylene) or other preferred places such as the top of the metal ventilation system were checked for eggs and eggs were collected. Depending on the four-hour time slot when the eggs were collected, one could assess the

time point when oviposition happened. The audio or video recordings gave further hints, such as a sound of an egg falling on ground (laying nest or ventilation box) or a hen staying for a long time in the laying nest.

Table 1. Blood sampling table for each test series.

Day	Sampling Point	Time
1	1	12:00 p.m.
	2	04:00 p.m.
	3	08:00 p.m.
	4	12:00 a.m.
	5	04:00 a.m.
	6	08:00 a.m.
2	7	12:00 p.m.
	8	04:00 p.m.
	9	08:00 p.m.
	10	12:00 a.m.
	11	04:00 a.m.
	12	08:00 a.m.
3	13	12:00 p.m.
	14	04:00 p.m.
	15	08:00 p.m.
	16	12:00 a.m.
	17	04:00 a.m.
	18	08:00 a.m.

2.2. Blood Sampling and Corticosterone Measurement

Blood samples were transferred to a heparin sample tube (1.3 mL micro sample tube, PE soft stopper, lithium heparin, SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany) and centrifuged within 5 min after collection for three minutes at 3500 g. Plasma was stored at -20°C until analysis. CORT concentrations in plasma samples were measured using a radioimmunoassay (RIA) following a protocol previously described by Goymann et al. [39] using a liquid scintillation counter (Beckman Coulter LS6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, Brea, CA, USA). The total amount of 216 plasma samples was processed in 3 batches between August and November 2021.

The time between capture and blood drawing was recorded in order to be able to evaluate a possible influence of a stress reaction triggered by capture and fixation of the chickens. The time between capture and blood sampling in each test animal averaged 2.5 min, with a minimum of 1 min and a maximum of 7 min (Supplementary Material Table S2). RIAs were performed in three batches with detection limits of 3.15–3.63 pg/mL. Measurement precision of the three RIA batches was good with an intra-assay coefficient of variation (CV) of 5.5–7.9%, inter-assay CV of 7.8%, intra-extraction CV of 4.7–7.1% and inter-extraction CV of 6.7%.

2.3. Behavioral Analysis

During each of the six test series, behavior and sounds of the animals were monitored with a surveillance camera (GeoVision, model GV-FER5701) fixed at the ceiling of the aviary and special microphones (in house product, Max Planck Institute for Biological Intelligence, Seewiesen, Germany) attached on the backs of the hens, covered by High-Visual chicken jackets to prevent pecking of the microphones. All test series took place one after the other in the same aviary. Therefore, each group of chickens was transferred to this room at least one week prior to test series for adaption to the new aviary. Recordings of video and audio files took place between 21 July 2021 and 09 October 2021. The analysis of video and audio files was conducted using the free software Audacity[®] (Version 2.4.2) and GeoVision Multicam Surveillance System (Version 8.5.7.0) using the ViewLog function and parallel auditory and visual evaluation. Around 426 h of microphone (wav files) and

video recordings (avi files) were obtained during the experimental phase. All audio tracks were visualized as spectrograms and the sounds simultaneously analyzed. Suspicious vocalizations were checked in the corresponding video records. Since dominance behavior was not always associated with vocalizations, full length of the video recordings was analyzed for such a behavior. The microphones failed to record sounds during the second test series; thus, from the third test series onward, an additional external microphone was placed in the aviary (Supplementary Material Table S1). Further, some events could not be visually assigned to the vocalizations because the chickens were sitting in a blind spot, such as under the ventilation or in the laying nest. These events were excluded from evaluation for physiological or distress-related CORT concentrations and mentioned separately. The same valuation was used for signs of distress occurring > 30 min prior sampling.

Chickens are known to produce a large amount of different call types [40–49], for which characteristic spectrograms, obtained during our experiments, are shown in Supplementary Material Figure S1. The sound spectrograms were particularly searched for short (0.33 s) and long (1 s) screams as a possible sign for discomfort or distress in the hens [48]. The distinction between distress calls and other call patterns was made according to the definition of Marx et al. in 2001 [50].

Aggressive behavior was defined as short attacks or fighting with serious harm caused to flock mates, e.g., to establish and maintain pecking hierarchy, to secure access to feed/water, to defend territory or due to stress [12]. Whereas dominant behavior was defined as threatening or pecking without harming flock mates, followed by immediate avoidance and subordination of the other hens without fighting [12].

2.4. Statistical Analyses

Descriptive statistics were applied to the individual animals and sampling times using R Studio (R version 4.1.3 (2022-03-10), Rstudio Team (2022). Rstudio: Integrated Development Environment for R. Rstudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>, accessed on 10 March 2022). Shapiro–Wilk test and quantile–quantile plots were used for testing for normal distribution. Differences between hens' hormone values were analyzed using the Kruskal–Wallis Test. For statistical analysis of the CORT values ($n = 216$), the first measurement of all hens was excluded, as there might be an influence of the anesthesia and transport distress shortly before the first blood sampling ($n = 204$). Studies in mice and rats have reported elevated CORT concentrations up to four hours after isoflurane anesthesia [51,52].

Linear mixed effects models are an efficient tool for analyzing complex data sets with repeated measurements and involve fixed factors as well as possible influences by random effects on the results. Robust regression of these allows the data sets to contain outliers as it reduces the weight of them [53]. Therefore, a robust variant of linear mixed effects model was used for our data set to describe the relationship between sampling time points as the fixed factor, hormone values as the dependent variable and the 12 hens as the random factor. A correction factor was not applied in order not to miss any effects. Time points as variables were dependent as measurements were repeated over three days in each animal (Supplementary Material Table S3), yet the single animals were independent variables. We did not expect any effects of age, since the age gap was only four weeks and our primary aim was the investigation of circadian CORT patterns in the blood. Therefore, we focused on the effect of the six sampling time points on CORT concentrations.

Estimated marginal means with a confidence level of 0.95 was applied as a post hoc test to describe differences between time point mean hormone concentrations. For evaluation of the post hoc test results, we used conventional thresholds for P-value interpretation as described before [54].

3. Results

3.1. Behaviour and Sounds

In our experiment, no aggression associated with pecking-related injury amongst flock mates was observed. Dominant behavior was apparent in all groups. Signs of dominance manifested in pecking head/comb/feathers during the day without harming, chasing hens away from food/water or out of the individual comfort zone and pecking during perching.

The number of experienced dominant behaviors which were accompanied by vocalizations varied strongly between individuals of the groups (Table 2).

Table 2. Number of experienced dominance behavior and blood sampling related distress per hen.

Hen	Being Pecked (Audio and Video)		Being Chased (Audio and Video)		Blood Sampling-Related Distress during a Test Series (Audio and Video)	
	Total/Day	Mean/Day	Total/Day	Mean/Day	Total	Mean/Day
01	0		0		0	
02	0–26	14.8	1–28	18	0	
03	0–2	0.3	0		4	1.3
04	0–4	1.3	0–1	0.2	1	0.3
05	0–7	3.0	0–2	0.8	1	0.3
06	0–1	0.3	0		1	0.3
07	0–2	0.5	0–1	0.2	0	
08	0–1	0.3	0		0	
09	0–2	0.5	0		5	1.7
10	0		0		2	0.7
11	0–1	0.2	0		1	0.3
12	0–1	0.2	0		0	

E.g., hen two of group 1 was pecked 1 to 26 times per day and chased up to 28 times during the first test series. In the second test series, pecking frequency decreased to none to 12 times a day, but chasing remained high with 1 to 20 incidents. Hen one of this group was never recorded being pecked or chased, hen three was only pecked twice in the whole experiment, and hen four experienced one to four pecking incidents a day and was chased once during the experiment. In the second group, hen five was exposed to the most dominance gestures, with none to seven daily pecking incidents and being chased a maximum of two times. Hens six and eight were only pecked two times in both test series of group two, and hen seven was pecked three times and chased once during the experimental phase. In groups one and two, dominant behavior decreased over time. The animals of the third group showed the least dominant behavior, with hen nine being pecked three times during the experiment, hens eleven and twelve each being exposed to one pecking incident and hen ten not being exposed to any dominance behavior.

Hens were not harmed by dominance behavior during the experiments. Frequently, threatening or attacking was not accompanied with calls. In only a few cases, hens screamed as a reaction to being pecked or when being picked up for blood sampling, especially during the night. These events were assessed as distress (Table 2 and Supplementary Material Table S2).

All hens except one laid a single egg per day (for hen ten, no oviposition was observed before or during the experiments). This hen started laying eggs about two weeks after the end of the experimental phase. These eggs had a lighter shell color than the eggs of the other hens and were much smaller. The other three hens of group three were observed during oviposition prior to the experiment, and three eggs per day were found in the

laying nests, likewise during the experiment. However, ovipositions could not always be recognized in the video recordings and could not be assigned to the individual hens, as most of them had very similar plumage color and all of them wore identical High-Visual chicken jackets. About half of the ovipositions were suspected based on behavior like staying in the laying nest for a longer time or audio recordings revealing sounds of an egg falling on hard ground, related to four-hour time slots where eggs were collected. Oviposition times were between 06:14 a.m. and 04:56 p.m.

3.2. CORT Concentrations

When CORT concentrations were analyzed over time, the first measurement was significantly higher than the following ones in eight out of twelve hens, with hen two showing the highest value of all animals (37,068 pg/mL) (Supplementary Material Table S4). The increased values during the first measurement point can be explained by the special conditions of this first sampling. The hens received permanent catheters before the first sampling. For this purpose, they were transported to the nearby surgical suite and underwent isoflurane inhalation anesthesia two hours before the first sampling. The increased CORT values can thus be attributed to the two-minute transport and to the subsequent isoflurane inhalation anesthesia and recovery phase. Studies in mice and rats have reported elevated CORT concentrations up to four hours after isoflurane anesthesia [51,52]. In order to avoid distortion of the circadian hormone profile, the first measurements were excluded from further statistics.

Excluding the concentrations of the first sampling, minimum CORT values of all hens ranged between 479.3 pg/mL and 1237.3 pg/mL, while maximum values were between 2319.4 pg/mL and 9958.9 pg/mL. The hens' mean CORT concentrations ranged between 885.7 ± 716.4 pg/mL and 4532.7 ± 2592.4 pg/mL (Supplementary Material Table S5). The data were not normally distributed (Supplementary Material Table S6 and Figure S2). Hens' distribution of CORT values differed between the individuals (Supplementary Material Figure S3).

Ten hens (all but hens two and ten) showed CORT profiles with several noticeable peaks over the course of three days. Hen two did not display many peaks over the three days, often just one peak per day. Hen ten showed the lowest CORT concentrations of all hens without any distinct peaks. Most animals showed the highest CORT concentrations at noon (12:00 p.m. or 04:00 p.m.) and at night (12:00 a.m.). This was confirmed by a robust linear mixed effects model revealing highest mean CORT concentrations between 12:00 p.m. and 04:00 p.m. ($p < 0.05$) (Figure 1, Supplementary Material Tables S7–S9). The nightly concentrations might indicate a second peak; however, this potential peak was statistically not significant ($0.12 < p < 0.53$) when a robust linear mixed effects model was applied to all hens (Figure 1, Supplementary Material Table S9). These results were confirmed by comparing the estimated marginal means of the CORT concentrations (Supplementary Material Tables S8 and S9).

When evaluating each group separately, the hens of group one (hens one to four) showed significant, highest mean CORT concentrations at 04:00 p.m. ($p < 0.05$) and a lower second, non-significant peak at 12:00 a.m. ($0.07 < p < 0.87$) (Supplementary Material Figure S4). The effect model plot for hens of group two (hens five to eight) showed a continuous rise from 08:00 p.m. to 08:00 a.m., followed by a decline without significant elevations (Supplementary Material Figure S5). Group three (hens nine to twelve) had a significant elevation at 12:00 p.m. ($p < 0.05$). Thereafter, CORT concentrations decreased until 08:00 a.m. (Supplementary Material Figure S6).

The intervals between individual peaks differed depending on the individual animals but were mainly 12 h (Supplementary Material Table S2). However, single hens had intervals of 8 h (e.g., hens five and twelve), 16 h (e.g., hen three) or 20 h (e.g., hen eight), which caused time shifts in the peaks for the following days (Figures 2–4, Supplementary Material Table S2).

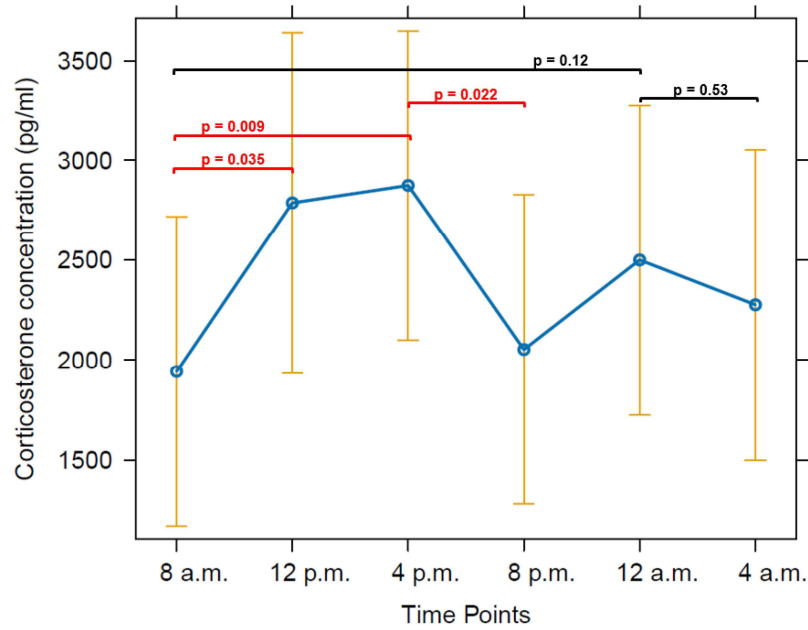


Figure 1. Effect plot for diurnal corticosterone concentrations of all hens (exclusive data from first time point as they might be elevated due to transport stress and isoflurane anesthesia). It pictures the effect of the sampling time points as a fixed factor on the estimated marginal means (emmeans) of CORT values as the dependent variable, indicating a pronounced peak between 12:00 p.m. and 04:00 p.m. as well as a tendency for a second peak at midnight. Lower and upper confidence levels are given in orange. Significant differences between time points (contrasts of emmeans) are displayed in red with according *p*-values, non-significant differences for the peak tendency at midnight are displayed in black with only upper and lower *p*-values.

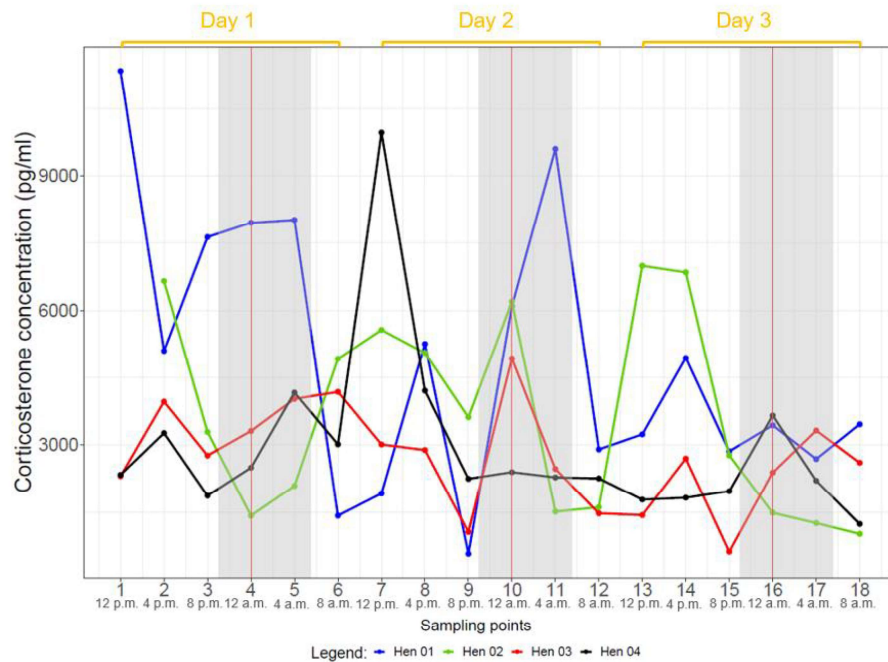


Figure 2. Plasma CORT profiles of hens of group 1 (hen 1 to hen 4) during 3 days. Samples of each hen were taken at 18 sampling points at intervals of 4 h. Grey background represents dark phase and the vertical red line represents midnight (12:00 a.m.).

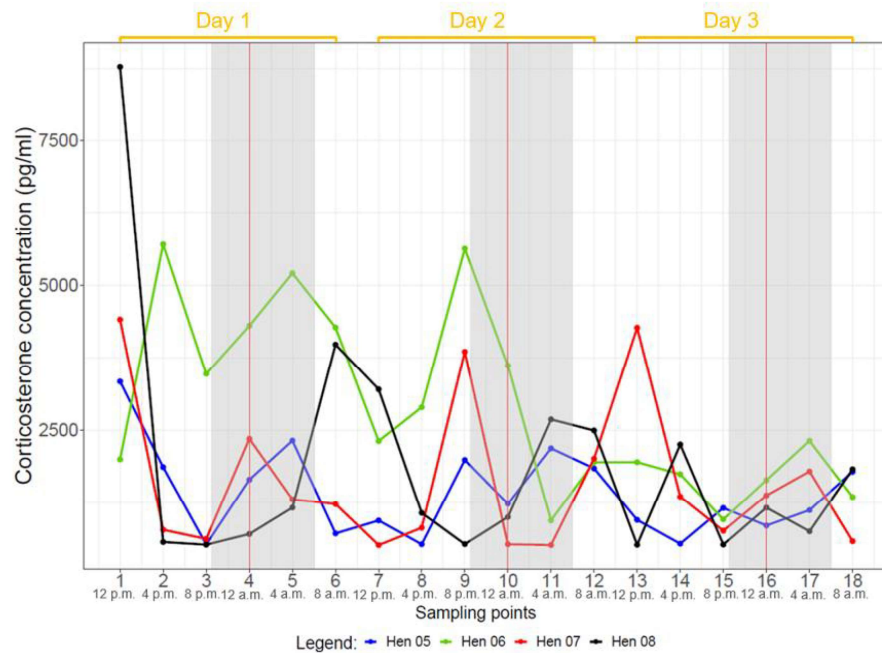


Figure 3. Plasma CORT profiles of hens of group 2 (hen 5 to hen 8) during 3 days. Samples of each hen were taken at 18 sampling points at intervals of 4 h. Grey background represents dark phase and the vertical red line represents midnight (12:00 a.m.).

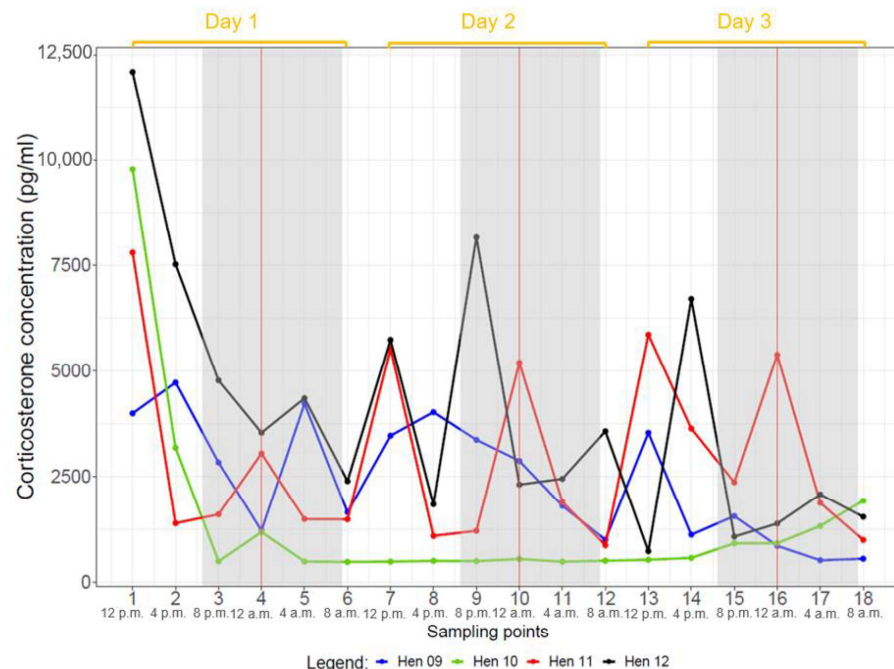


Figure 4. Plasma CORT profiles of hens of group 3 (hen 9 to hen 12) during 3 days. Samples of each hen were taken at 18 sampling points in intervals of 4 h. Grey background represents dark phase and the vertical red line represents midnight (12:00 a.m.).

The mean time span between catching and blood sampling was 2.5 min and was not correlated with CORT concentrations (Supplementary Material Tables S10 and S11). Regarding all blood sampling times ($n = 216$), 82% were ≤ 3 min, 16% > 3 min, and for 2%, no data were obtained due to missing video recordings.

In total, only 29.6% of obtained CORT concentrations showed elevations ($n = 64$). Out of these, 65.6% were associated with a collection time ≤ 3 min, including 4.7% within 1 min

and 31.3% with a time span > 3 min (Supplementary Material Table S2). Due to missing video recordings of the blood sampling, 3.1% of the CORT peaks could not be associated with the time span of blood sampling. From CORT peaks with a collection time ≤ 3 min, 33 peaks (78.6%) were not related to previous distress < 30 min before sampling, four peaks (9.5%) were associated with previous distress < 30 min before sampling, and five peaks (11.9%) could not be clearly assigned to previous distress or distress that occurred > 30 min before sampling. For 20 CORT peaks (9.2%), a time span of four to seven minutes was required due to problems with blood collection. Six of these elevations (2.7%) were clearly assigned to distress in the hens, including a sampling time of seven minutes, which only appeared once. The remaining 14 peaks, associated with a duration of four to six minutes (6.5%), were not related to obvious distress noticeable by video and audio recordings. A total of 15 blood samples (6.9%) did not show elevated CORT concentrations but were associated with sampling times of four to six minutes.

With regard to oviposition, exact time points for individual hens could not be determined, since monitoring of the laying nests was not possible, and similar plumage color and vests hindered differentiation of the individual hens. But, relating the nearest CORT peaks to the observed oviposition of all hens per day (between 06:14 a.m. and 04:56 p.m., as described above), the CORT peaks were estimated to occur 2 h 55 min to 10 h 12 min before oviposition.

No correlation was found for CORT peaks vs. aggressive behavior, as no aggression with harming was detected during the experiments. In 15.6% of the peaks, the increase in CORT was associated with exposure to dominance behavior as observed in the video analysis. An association with dominance behavior was uncertain for a further 7.8% of the CORT peaks. In these cases, a peak could not conclusively be assigned to dominance because either such behavior was not unequivocally visible on the videos, or it happened more than 30 min before blood sampling. The remaining 76.6% of CORT peaks were not associated with any observed dominant behavior.

In summary, most CORT peaks were not associated with overt behavioral events, neither were they due to shortcomings of the blood sampling.

4. Discussion

Under the given keeping conditions, the grouped CORT concentrations of all hens showed a significant peak between 12:00 p.m. and 04:00 p.m. ($p < 0.05$), and a further noticeable although non-significant peak at 12:00 a.m. ($0.12 < p < 0.53$) (Figure 1). As all groups were kept under natural light through the daylight windows during the experiments, the duration of photophase varied between groups: 15L:9D (July, group one), 14L:10D (August, group two) and 11L:13D (September/October, group three). Regardless of the duration of photophase, every group showed one statistically significant CORT peak or at least a tendency for a CORT peak. All groups showed pronounced peaks during night and day when looking at the individual hens' CORT concentrations (Figures 2–4). In groups one and three, major peaks of CORT concentrations were inconsistent with the time of day, but in most cases, they occurred either between 12:00 a.m. and 04:00 a.m. or between 12:00 p.m. and 04:00 p.m. In contrast, most hens of group two showed peaks at 04:00 a.m. but also often at 08:00 p.m. Other time points showed individually different peaks but no general pattern. In most cases, individual peaks occurred at intervals of about 12 h, however, there were some interindividual variations. Major peaks showed up in intervals of 24 h. When the individual time span between the CORT peaks differed from 12 h, the following daily patterns were shifted.

Summing up, despite distinct individual variations in the time of the CORT peaks among the hens, most peaks occurred between 12:00 p.m. and 04:00 p.m. and between 12:00 a.m. and 04:00 a.m. and in intervals of 12 h.

Absolute CORT measures in domestic chickens differ heavily among studies [26–31,55]. Summing up, basal CORT concentrations have been described to range between 270 pg/mL and 2700 pg/mL [26–31,55]. The peak concentrations were reported to amount to 800 pg/mL

to 6300 pg/mL [27–31,55]. The CORT concentrations obtained here were generally within this range.

Reasons for the circadian rhythm of CORT concentrations showing major peaks in 24 h intervals can only be speculated. One possible explanation is that circadian patterns of hormone activities or concentrations are controlled by the duration of photophase, as has been shown in other investigations [56]. The secretion of CORT is regulated by the hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA-axis) via the adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and local adrenocortical catecholamine secretion [57,58]. Considering the influence of light on CORT production, an increased photoperiod under stable conditions is able to stimulate gonadotropine-releasing hormone (GnRH) secretion, which, in turn, enhances steroid production [59]. So far, two types of GnRH have been described: cGnRH-I (Chicken GnRH-I) and cGnRH-II (Chicken GnRH-II) [60–62]. Melatonin, in contrast, regulates the release of the gonadotropine inhibitory hormone (GnIH), which depresses steroid secretion and, therefore, is a natural antagonist of CORT [59]. However, our observations show no alterations in the egg laying rate of the three groups under varying photoperiod from 11 to 15 h scotophase, with the exception of the non-laying hen ten. The rise in CORT seen between midday and the afternoon during our experiments could be a result of a melatonin decrease [63]. It is known that constant light exposition during early age can suppress melatonin secretion and disrupt circadian rhythm, accompanied by elevated CORT [64]. Low melatonin concentrations, in turn, are related to depression and distressed behavior [65]. High light intensity (≥ 30 Lux) increases severe feather pecking and mortality, and, therefore, distress, in hens [66]. In comparison to artificial light, natural light has been reported to decrease serum CORT concentrations, which seems to be related to ultraviolet light [67,68]. Investigations in turkeys which also belong to the order Galliformes revealed a pattern with two CORT peaks per day under a 14L:10D light regime [69], although measured in different animals. A major CORT peak occurred at the beginning or middle of photophase and a second minor one at scotophase.

Revealing underlying mechanisms of circadian rhythm such as the impact of GnRH or melatonin was not the subject of this study but the influence of light programs, natural and artificial lighting and light intensities as well as avian perception of light intensity (gallilux) should be part of subsequent studies, where concentrations of CORT, GnRH and melatonin should be measured as well. Combining the analysis of many possible influencing factors would have required many more animals. We chose to focus on the main question of a possible circadian CORT rhythm to reduce the number of animals ($n = 12$) according to the 3R principle for gaining a first insight. During our study, all animals were successively sheltered in the same aviary, handled by the same experimenter and were kept under natural light through the daylight windows to minimize the effect of the environment (such as air flow rate, angle of light incidence, artificial light, equipment of the aviary, stocking density or change of the experimenter) on our results.

Periodically occurring stressors might represent a second possible cause for the fluctuations in the CORT concentrations in the hens. Stressors might include a struggle for resources such as feed and water after oviposition, which could explain the higher CORT concentrations between midday and afternoon, matching a pattern described in an earlier study in broilers [30] as well as the periodical blood sampling.

We did not take the social hierarchy/status of each individual into account, as their similar plumage color and High-Visual chicken jackets hindered the distinction of the individuals. Miniature microphones were placed on every chicken's back to differentiate possible distress calls of the individuals. Only two hens (hens two and five) had a lighter plumage color as subjectively perceived by the investigator, and, therefore, could be fitted into hierarchy. Vocal recordings of individuals did not allow for any conclusions to be drawn about the social status of every hen, as hierarchy was mostly maintained by dominance behavior without fighting and vocalizations. Hens two and five, both with a plumage with a brighter color of brown than their mates and obviously a low position in the hierarchy, were each subdued by their flock mates. Their lighter plumage color which

led to an easy identification in the video recordings might have encouraged pecking and threatening, since these hens differed phenotypically from the others who had a dark brown plumage. Although both hens with light brown plumage experienced up to 20 pecking instances and 28 chasing instances, they did not consistently have the highest CORT values of the group, and their CORT increases were not always associated with previously experienced dominance behavior (Table 2, Supplementary Material Tables S2 and S4).

However, due to the speed of blood sampling and the catching of the hens at a short time interval, these potential stressors are unlikely to have caused the CORT rise between midday and afternoon. In particular, these events were the same at all sampling points. It has been described before that CORT increases occurred 45 s to 3 min after the start of blood sampling [16–18]. In our investigation, the mean time span from the start of catching to the end of blood sampling was 2.5 min, and there was no positive association between the duration of the sampling time and CORT concentrations. Overall, 82% of all blood samplings and 65.6% of the CORT peaks that occurred were associated with a sampling time (from catch to finished blood sampling) of ≤ 3 min. Nonetheless, 14 CORT peaks with a sampling time of four to six minutes (6.5%) were not related to obvious distress noticeable by video and audio recordings and, therefore, might be a result of prolonged handling for blood sampling. As 15 blood samples (6.9%) associated with sampling times of four to six minutes did not show elevated CORT concentrations, we cannot conclude that prolonged handling causes CORT elevations in our study. These results demonstrate that our training procedure presumably was sufficient to reduce stress responses in the hens [38]. Thus, our CORT values measured in the blood appear to reflect physiological fluctuations.

Video and audio recordings within our study did not prove the thesis that blood CORT elevations are mainly influenced by social interactions, especially by aggressive behavior of the hens, since only dominance but no aggression according to our definition was noticeable. Barely visible gestures such as eye contact or head position may have a significant impact on social interactions and associated distress [32]. When all hens were regarded, only about 15.6% of the documented CORT increases were associated with visually recognizable dominance behavior.

Regarding the role of elevated CORT concentrations during daytime, we can only speculate. Apart from their importance in organisms' stress reactions, glucocorticoids like CORT have numerous important functions, showing a catabolic effect on proteins and increasing gluconeogenesis from amino acids as well as glycogenolysis in the liver, which leads to an increase in glucose concentration in the blood [14]. Furthermore, CORT increases fatty acid synthesis in the liver [70]. Immunosuppression may occur due to reduced protein biosynthesis caused by increased CORT concentrations, which leads to lower antibody production and suppression of cellular defense [7,13].

The role of CORT in reproduction has not yet been clearly defined. On the one hand, there are studies that indicate a negative influence of CORT on breeding behavior in favor of foraging [71,72]. Other studies show that increased plasma CORT concentrations increase foraging in parents and, consequently, lead to increased body weight in chicks, providing a fitness advantage [73]. However, several studies are consistent with increased food intake and foraging behavior in birds with high CORT concentrations [73–75]. The laying hens in our experiment did not show any signs of incubating the laid eggs during the four-hour time slot before we removed the eggs. Research on parenting behavior was not possible as no offspring was produced. We did not look explicitly at the food intake. But in general, food intake was not noticeably increased in comparison to the time before the experimental procedure.

The impact of CORT on the ovaries and ovulation is unclear so far, as both excitatory and inhibitory effects have been described [15]. But the act of oviposition itself seems to play a role in the elevation of CORT, and it is suggested that estrogen, progesterone and the luteinizing hormone (LH) with its peak likewise have a crucial impact on the elevation of CORT after oviposition [76–79]. The LH peak as well as the action of mesotocin and arginine vasotocin promote muscle contractions in the oviduct, required for oviposition [80].

An inhibition of the secretion of LH may be induced by permanently increased blood CORT concentrations, in turn causing lower sex steroid concentrations, and thus affecting further egg formation and oviposition [81,82]. In contrast, Etches (1979) described a circadian CORT rhythm with a CORT increase during scotophase in White Leghorn hens which appeared to be independent of ovulation [55]. Hence, we did not expect the circadian rhythm in chickens to be strongly influenced by ovulation. Nevertheless, as injections of CORT are able to induce ovulation and CORT concentrations appear to be regulated by a circadian rhythm, there is some evidence for a relation between ovulation and circadian CORT rhythm, but the underlying mechanisms are not clarified yet [55,83,84].

In our study, oviposition occurred daily in 11 out of 12 laying hens during the experiment, but video recordings did not allow us to observe the exact time. It is remarkable that hen ten, the only hen which did not lay any eggs during the experimental phase, at the same time displayed the lowest CORT values of all hens with nearly no fluctuations. Since this hen had not laid any eggs before the start of the experiment, it can be deduced that she was not yet in a reproductive state at the time the experiment was carried out. Suppressing effects of CORT on oviposition in our study are unlikely because no direct effects of CORT could be proved in hen ten or the other hens as we would have expected.

Further study should be performed to examine the correlation of CORT with egg production and oviposition where estrogen, progesterone and LH as well as mesotocin and arginine vasotocin should be measured additionally to CORT under video documentation of oviposition time and labelling of the individuals.

The results obtained in our study serve as a basis for further research. Regarding practical relevance in veterinary medicine, our results can be used as an additional tool for distress assessment. CORT values are not a stand-alone indicator for distress since a single value does not provide information about basal or actual stress-related CORT values. Considering CORT daily fluctuations, one should take a minimum of two blood samples for CORT measurement when not combining distress assessment with other blood-related measurements such as the H:L ratio, leucocyte count or blood chemical parameters. For this, we would recommend taking samples in the morning within the first two hours after dawn and in the late afternoon in order to obtain non-elevated CORT concentrations and calculating the average CORT concentration. As a result, the influence of individual physiological fluctuations can be reduced, and the significance is increased. Behavioral observations or determination of the H:L ratio (elevation by stress) [10,27,85,86] may support the diagnosis of distress-related CORT elevation, whereas measurement of CORT concentrations might help to distinguish stress-related (high CORT) from infection-related (low CORT) leucocytosis in the blood [87,88].

Blood chemical parameters may be altered by elevated CORT concentrations which may occur due to prolonged distress. Elevated glucose values in chickens (reference 227–300 mg/dL) can be found as a result of increased gluconeogenesis and glycogenolysis [14,89,90]. Furthermore, creatinine values are higher in prolonged distress periods than physiological reference values which can be determined by laboratory diagnostics (reference 0.9–1.8 mg/dL) [90,91]. Changes in lipid metabolism lead to steatosis hepatitis in chickens and may result in elevated serum bile acids [91–94].

For the application of CORT measurement in practice, commercial ELISA kits can be used instead of a time-consuming and expensive measurement using radioimmunoassay. However, only a few of them (e.g., Corticosterone ELISA kit, Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA) are suitable or validated for the measurement of avian CORT [95].

5. Conclusions

This study reveals a circadian rhythm of blood CORT concentrations in domestic chickens with clear individual variations. Throughout the day, blood CORT concentrations in laying hens show two peaks, with CORT concentrations most probably regulated by photophase but possibly also by social interactions and reproduction, whereby statistically, only the major peak between 12:00 p.m. and 04:00 p.m. is significant ($p < 0.05$). The second

tendency for a peak occurs at 12:00 a.m. ($0.12 < p < 0.53$). In most cases, individual peaks occurred in intervals of about 12 h; however, there were some interindividual variations. Major peaks showed up in intervals of 24 h. Further studies are necessary to investigate the reproducibility of our results, seasonal and stressor type influences, the influence of light programs, natural and artificial lighting, light intensities as well as avian perception of light intensity (gallilux), while measuring blood concentrations of CORT, GnRH and melatonin. A complementary study should examine the correlation of CORT with egg formation and oviposition where estrogen, progesterone and LH, as well as mesotocin and arginine vasotocin have to be determined additionally to CORT, adding video documentation of oviposition time and labelling of the individuals. In our study, we exclusively focused on the verification of a circadian CORT rhythm in laying hens under social interactions. Our results proved the presence of a circadian CORT rhythm in chickens and created a basis for further basic research.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ani14060873/s1>. Table S1: Information on the experimental phase. Table S2: Observations at corticosterone peaks. Table S3: Summarized blood corticosterone measurements (pg/mL), descriptive statistics of all hens for each time point, excl. first measurement of each hen. Table S4: Total blood corticosterone measurements (pg/mL) of all hens for all sampling points. Table S5: Blood corticosterone measurements (pg/mL), descriptive statistics for each hen, excl. first measurement of each hen. Table S6: Shapiro-Wilk-Test for summarized blood corticosterone measurements of all hens for each time point, excl. first measurement of each hen. Table S7: Robust linear mixed model fit by DASTAU for summarized blood corticosterone measurements (pg/mL) of all hens for each time point, excl. first measurement of each hen. Table S8: Estimated marginal means (emmeans) of summarized blood corticosterone measurements (pg/mL) of all hens for each time point, excl. first measurement of each hen, confidence level used: 0.95. Table S9: Contrasts of emmeans of summarized blood corticosterone measurements (pg/mL) of all hens for each time point, excl. first measurement of each hen, confidence level used: 0.95. Table S10: Correlation amount distress-related peaks with blood sampling time. Table S11: Pearson's Chi-squared test, Correlation distress-related peaks with blood sampling time. Figure S1: Spectrograms of call types: (a) food calls, (b) gakel calls, (c) contentment call, (d) short scream, (e) long scream, (f) growling, (g) whining, (h) mixed call, (i) single cluck, (j) double cluck, (k) fast clucks. Figure S2: Q-Q plot for total corticosterone measurements, excl. first measurement of each hen. Figure S3: Kruskal Wallis rank sum test for Corticosterone measurements of all hens, excl. first measurement of each hen. Figure S4: Corticosterone effect plot (pg/mL) for hens 01 to 04, excl. first measurement of each hen. Figure S5: Corticosterone effect plot (pg/mL) for hens 05 to 08, excl. first measurement of each hen. Figure S6: Corticosterone effect plot (pg/mL) for hens 09 to 12, excl. first measurement of each hen.

Author Contributions: Conceptualization and methodology, T.H., R.K. and M.G.; software, T.H.; validation, T.H.; formal analysis, T.H.; investigation, T.H.; resources, R.K. and M.G.; data curation, T.H.; writing—original draft preparation, T.H.; writing—review and editing, M.R., R.K. and M.G.; visualization, T.H.; supervision, R.K. and M.G.; project administration, M.G. 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 experiments were conducted in accordance with German animal welfare regulations and with permission from the German authorities (reference number ROB 55.2-2532.Vet_02-20-161).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article and Supplementary Materials.

Acknowledgments: We would like to acknowledge the staff of the MPI of Biological Intelligence for their part and contributions to the laboratory and analyzing work of this study and Yury Zablotzki for supporting the compilation of statistics.

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

References

1. Deviche, P.; Bittner, S.; Gao, S.; Valle, S. Roles and Mechanistic Bases of Glucocorticoid Regulation of Avian Reproduction. *Integr. Comp. Biol.* **2017**, *57*, 1184–1193. [[CrossRef](#)]
2. Heiblum, R.; Arnon, E.; Gvayahu, G.; Robinzon, B.; Snapir, N. Short-term stress increases testosterone secretion from testes in male domestic fowl. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2000**, *120*, 55–66. [[CrossRef](#)]
3. Deviche, P.J.; Hurley, L.L.; Fokidis, H.B.; Lerbour, B.; Silverin, B.; Silverin, B.; Sabo, J.; Sharp, P.J. Acute stress rapidly decreases plasma testosterone in a free-ranging male songbird: Potential site of action and mechanism. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2010**, *169*, 82–90. [[CrossRef](#)]
4. Deviche, P.; Gao, S.; Davies, S.; Sharp, P.J.; Dawson, A. Rapid stress-induced inhibition of plasma testosterone in free-ranging male rufous-winged sparrows, *Peucaea carpalis*: Characterization, time course, and recovery. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2012**, *177*, 1–8. [[CrossRef](#)]
5. Abolins-Abols, M.; Hanauer, R.E.; Rosvall, K.A.; Peterson, M.P.; Ketterson, E.D. The effect of chronic and acute stressors, and their interaction, on testes function: An experimental test during testicular recrudescence. *J. Exp. Biol.* **2018**, *221*, jeb180869. [[CrossRef](#)]
6. Rich, E.L.; Romero, L.M. Exposure to chronic stress downregulates corticosterone responses to acute stressors. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2005**, *288*, R1628–R1636. [[CrossRef](#)]
7. Sapolsky, R.M.; Romero, L.M.; Munck, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* **2000**, *21*, 55–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Lu, S.; Wei, F.; Li, G. The evolution of the concept of stress and the framework of the stress system. *Cell Stress* **2021**, *5*, 76–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Owen, D.J.; Lane, J.M. High levels of corticosterone in feather-plucking parrots (*Psittacus erithacus*). *Vet. Rec.* **2006**, *158*, 804–805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. El-Lethey, H.; Aerni, V.; Jungi, T.W.; Wechsler, B. Stress and feather pecking in laying hens in relation to housing conditions. *Br. Poult. Sci.* **2000**, *41*, 22–28. [[CrossRef](#)]
11. Carere, C.; van Oers, K. Shy and bold great tits (*Parus major*): Body temperature and breath rate in response to handling stress. *Physiol. Behav.* **2004**, *82*, 905–912. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Queiroz, S.A.; Cromberg, V.U. Aggressive behavior in the genus *Gallus* sp. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* **2006**, *8*, 1–14. [[CrossRef](#)]
13. Schmidt, K.L.; Soma, K.K. Cortisol and corticosterone in the songbird immune and nervous systems: Local vs. systemic levels during development. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2008**, *295*, R103–R110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Brown, C.L.J.; Zaytsoff, S.J.M.; Montina, T.; Inglis, G.D. Corticosterone-Mediated Physiological Stress Alters Liver, Kidney, and Breast Muscle Metabolomic Profiles in Chickens. *Animals* **2021**, *11*, 3056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Johnson, A.L. Reproduction in the Female. In *Sturkie's Avian Physiology*, 6th ed.; Scanes, C.G., Sturkie, P.D., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2015; pp. 635–665, ISBN 9780124071605.
16. Beuving, G.; Vonder, G. Effect of stressing factors on corticosterone levels in the plasma of laying hens. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1978**, *35*, 153–159. [[CrossRef](#)]
17. Wingfield, J.C.; Smith, J.P.; Farner, D.S. Endocrine Responses of White-Crowned Sparrows to Environmental Stress. *Condor* **1982**, *84*, 399. [[CrossRef](#)]
18. Dickens, M.J.; Balthazart, J.; Cornil, C.A. Brain aromatase and circulating corticosterone are rapidly regulated by combined acute stress and sexual interaction in a sex-specific manner. *J. Neuroendocrinol.* **2012**, *24*, 1322–1334. [[CrossRef](#)]
19. Blas, J. Stress in Birds. In *Sturkie's Avian Physiology*, 6th ed.; Scanes, C.G., Sturkie, P.D., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2015; pp. 769–810, ISBN 9780124071605.
20. Wada, H.; Hahn, T.P.; Breuner, C.W. Development of stress reactivity in white-crowned sparrow nestlings: Total corticosterone response increases with age, while free corticosterone response remains low. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2007**, *150*, 405–413. [[CrossRef](#)]
21. Wada, H.; Salvante, K.G.; Wagner, E.; Williams, T.D.; Breuner, C.W. Ontogeny and individual variation in the adrenocortical response of zebra finch (*Taeniopygia guttata*) nestlings. *Physiol. Biochem. Zool.* **2009**, *82*, 325–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Breuner, C.W.; Orchinik, M.; Hahn, T.P.; Meddle, S.L.; Moore, I.T.; Owen-Ashley, N.T.; Sperry, T.S.; Wingfield, J.C. Differential mechanisms for regulation of the stress response across latitudinal gradients. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2003**, *285*, R594–R600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Carere, C.; Eens, M. Unravelling animal personalities: How and why individuals consistently differ. *Behaviour* **2005**, *142*, 1149–1157. [[CrossRef](#)]
24. Cockrem, J.F. Stress, corticosterone responses and avian personalities. *J. Ornithol.* **2007**, *148*, 169–178. [[CrossRef](#)]
25. Beuving, G.; Vonder, G. Comparison of the adrenal sensitivity to ACTH of laying hens with immobilization and plasma baseline levels of corticosterone. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1986**, *62*, 353–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ralph, C.R.; Hemsworth, P.H.; Leury, B.J.; Tilbrook, A.J. Relationship between plasma and tissue corticosterone in laying hens (*Gallus gallus domesticus*): Implications for stress physiology and animal welfare. *Domest. Anim. Endocrinol.* **2015**, *50*, 72–82. [[CrossRef](#)]
27. Weimer, S.L.; Wideman, R.F.; Scanes, C.G.; Mauromoustakos, A.; Christensen, K.D.; Vizzier-Thaxton, Y. An evaluation of methods for measuring stress in broiler chickens. *Poult. Sci.* **2018**, *97*, 3381–3389. [[CrossRef](#)]
28. Johnson, A.L.; van Tienhoven, A. Plasma concentrations of six steroids and LH during the ovulatory cycle of the hen, *Gallus domesticus*. *Biol. Reprod.* **1980**, *23*, 386–393. [[CrossRef](#)]

29. Johnson, A.L. Comparison of three serial blood sampling techniques on plasma hormone concentrations in the laying hen. *Poult. Sci.* **1981**, *60*, 2322–2327. [[CrossRef](#)]
30. de Jong, I.C.; van Voorst, A.; Erkens, J.H.; Ehlhardt, D.A.; Blokhuis, H.J. Determination of the circadian rhythm in plasma corticosterone and catecholamine concentrations in growing broiler breeders using intravenous cannulation. *Physiol. Behav.* **2001**, *74*, 299–304. [[CrossRef](#)]
31. Fallahsharoudi, A.; de Kock, N.; Johnsson, M.; Ubhayasekera, S.J.; Kumari, A.; Bergquist, J.; Wright, D.; Jensen, P. Domestication effects on stress induced steroid secretion and adrenal gene expression in chickens. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 15345. [[CrossRef](#)]
32. Carvalho, R.R.; Palme, R.; da Silva Vasconcellos, A. An integrated analysis of social stress in laying hens: The interaction between physiology, behaviour, and hierarchy. *Behav. Process.* **2018**, *149*, 43–51. [[CrossRef](#)]
33. Törnqvist, E.; Annas, A.; Granath, B.; Jalkestén, E.; Cotgreave, I.; Öberg, M. Strategic focus on 3R principles reveals major reductions in the use of animals in pharmaceutical toxicity testing. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e101638. [[CrossRef](#)]
34. Aske, K.C.; Waugh, C.A. Expanding the 3R principles: More rigour and transparency in research using animals. *EMBO Rep.* **2017**, *18*, 1490–1492. [[CrossRef](#)]
35. Directive 1999/74/EG. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/1999/74/oj> (accessed on 23 January 2024).
36. Directive 2010/63/EU. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj> (accessed on 23 January 2024).
37. Korbé, R.; Reese, S.; Liebich, H.-G. Fixationstechniken und Anästhesieverfahren. In *Anatomie der Vögel: Klinische Aspekte und Propädeutik. Zier-, Greif-, Zoo-, Wildvögel und Wirtschaftsgeflügel*, 2. Aufl.; König, H.E., Korbé, R., Liebich, H.G., König, H.E., Liebich, H.-G., Korbé, R.T., Eds.; Schattauer: Stuttgart, Germany, 2012; pp. 293–304, ISBN 9783794564873.
38. Webb, M.L.; Mashaly, M.M. Effect of adaptation to handling on the circulating corticosterone concentration of laying hens. *Br. Poult. Sci.* **1984**, *25*, 425–427. [[CrossRef](#)]
39. Goymann, W.; Trappschuh, M.; Jensen, W.; Schwabl, I. Low ambient temperature increases food intake and dropping production, leading to incorrect estimates of hormone metabolite concentrations in European stonechats. *Horm. Behav.* **2006**, *49*, 644–653. [[CrossRef](#)]
40. Collias, N.; Joos, M. The Vocal Repertoire of the Red Junglefowl: A Spectrographic Classification and the Code of Communication. *Condor* **1987**, *89*, 510–524. [[CrossRef](#)]
41. Gyger, M.; Marler, P.; Pickert, R. Semantics of an Avian Alarm Call System: The Male Domestic Fowl, *Gallus domesticus*. *Behaviour* **1987**, *102*, 15–39. [[CrossRef](#)]
42. Evans, C.S.; Marler, P. Food calling and audience effects in male chickens, *Gallus gallus*: Their relationships to food availability, courtship and social facilitation. *Anim. Behav.* **1994**, *47*, 1159–1170. [[CrossRef](#)]
43. Zimmerman, P.; Koene, P. The effect of frustrative nonreward on vocalisations and behaviour in the laying hen, *Gallus gallus domesticus*. *Behav. Process.* **1998**, *44*, 73–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Evans, C.S.; Evans, L. Chicken food calls are functionally referential. *Anim. Behav.* **1999**, *58*, 307–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Zimmerman, P.H.; Koene, P.; van Hooft, J.A. Thwarting of behaviour in different contexts and the gack-call in the laying hen. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2000**, *69*, 255–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Evans, C.S.; Evans, L. Representational signalling in birds. *Biol. Lett.* **2007**, *3*, 8–11. [[CrossRef](#)]
47. Kokolakis, A.; Smith, C.L.; Evans, C.S. Aerial alarm calling by male fowl (*Gallus gallus*) reveals subtle new mechanisms of risk management. *Anim. Behav.* **2010**, *79*, 1373–1380. [[CrossRef](#)]
48. Tefera, M. Acoustic Signals in Domestic Chicken (*Gallus gallus*): A Tool for Teaching Veterinary Ethology and Implication for language learning. *Ethiop. Vet. J.* **2012**, *16*, 77–84. [[CrossRef](#)]
49. McGrath, N.; Dunlop, R.; Dwyer, C.; Burman, O.; Phillips, C.J. Hens vary their vocal repertoire and structure when anticipating different types of reward. *Anim. Behav.* **2017**, *130*, 79–96. [[CrossRef](#)]
50. Marx, G.; Leppelt, J.; Ellendorff, F. Vocalisation in chicks (*Gallus gallus dom.*) during stepwise social isolation. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2001**, *75*, 61–74. [[CrossRef](#)]
51. Jacobsen, K.R.; Kalliokoski, O.; Teilmann, A.C.; Hau, J.; Abelson, K.S.P. The effect of isoflurane anaesthesia and vasectomy on circulating corticosterone and ACTH in BALB/c mice. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2012**, *179*, 406–413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Bekkbat, M.; Merrill, L.; Kelly, S.D.; Lee, V.K.; Neigh, G.N. Brief anesthesia by isoflurane alters plasma corticosterone levels distinctly in male and female rats: Implications for tissue collection methods. *Behav. Brain Res.* **2016**, *305*, 122–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Koller, M. robustlmm: An R Package for Robust Estimation of Linear Mixed-Effects Models. *J. Stat. Softw.* **2016**, *75*, 1–24. [[CrossRef](#)]
54. Raiola, G.; Di Tore, P.A. Statistical study on bodily communication skills in volleyball to improve teaching methods. *J. Hum. Sport Exerc.* **2012**, *7*, 468–488. [[CrossRef](#)]
55. Etches, R.J. Plasma concentrations of progesterone and corticosterone during the ovulation cycle of the hen (*Gallus domesticus*). *Poult. Sci.* **1979**, *58*, 211–216. [[CrossRef](#)]
56. Geng, A.L.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Wang, H.H.; Chu, Q.; Yan, Z.X.; Liu, H.G. Effects of lighting regimes on performance, pineal melanopsin expression and melatonin content in native laying hens aged from 19 to 34 weeks. *Poult. Sci.* **2022**, *101*, 101567. [[CrossRef](#)]
57. Leliavski, A.; Dumbell, R.; Ott, V.; Oster, H. Adrenal clocks and the role of adrenal hormones in the regulation of circadian physiology. *J. Biol. Rhythm.* **2015**, *30*, 20–34. [[CrossRef](#)]

58. Yang, Y.; Han, W.; Zhang, A.; Zhao, M.; Cong, W.; Jia, Y.; Wang, D.; Zhao, R. Chronic corticosterone disrupts the circadian rhythm of CRH expression and m6A RNA methylation in the chicken hypothalamus. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2022**, *13*, 29. [[CrossRef](#)]
59. Baxter, M.; Bédécarrats, G.Y. Evaluation of the Impact of Light Source on Reproductive Parameters in Laying Hens Housed in Individual Cages. *J. Poult. Sci.* **2019**, *56*, 148–158. [[CrossRef](#)]
60. Shimizu, M.; Bédécarrats, G.Y. Identification of a novel pituitary-specific chicken gonadotropin-releasing hormone receptor and its splice variants. *Biol. Reprod.* **2006**, *75*, 800–808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Ubuka, T.; Bentley, G.E.; Tsutsui, K. Neuroendocrine regulation of gonadotropin secretion in seasonally breeding birds. *Front. Neurosci.* **2013**, *7*, 38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Bhattacharya, T.K.; Chatterjee, R.N.; Dange, M.; Bhanja, S.K. Polymorphisms in GnRHI and GnRHII genes and their association with egg production and egg quality traits in chicken. *Br. Poult. Sci.* **2019**, *60*, 187–194. [[CrossRef](#)]
63. Gwinner, E.; Brandstätter, R. Complex bird clocks. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2001**, *356*, 1801–1810. [[CrossRef](#)]
64. Yang, Y.; Cong, W.; Liu, J.; Zhao, M.; Xu, P.; Han, W.; Wang, D.; Zhao, R. Constant light in early life induces fear-related behavior in chickens with suppressed melatonin secretion and disrupted hippocampal expression of clock- and BDNF-associated genes. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2022**, *13*, 67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Tchekalarova, J.; Stoyanova, T.; Ilieva, K.; Mitreva, R.; Atanasova, M. Agomelatine treatment corrects symptoms of depression and anxiety by restoring the disrupted melatonin circadian rhythms of rats exposed to chronic constant light. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2018**, *171*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Kjaer, J.; Vestergaard, K. Development of feather pecking in relation to light intensity. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **1999**, *62*, 243–254. [[CrossRef](#)]
67. Fouda, M.; Darwish, R.; Abou-ismail, U.; Saad, A. Comparative effects of natural and artificial light on behaviour, performance and welfare of broiler chickens. *Mansoura Vet. Med. J.* **2018**, *19*, 321–333.
68. Sobotik, E.B.; Nelson, J.R.; Archer, G.S. How does ultraviolet light affect layer production, fear, and stress. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2020**, *223*, 104926. [[CrossRef](#)]
69. Proudman, J.A. Daily rhythm of prolactin and corticosterone in unrestrained, incubating turkey hens. *Domest. Anim. Endocrinol.* **1991**, *8*, 265–270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Scanes, C.G. Biology of stress in poultry with emphasis on glucocorticoids and the heterophil to lymphocyte ratio. *Poult. Sci.* **2016**, *95*, 2208–2215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Astheimer, L.B.; Buttemer, W.A.; Wingfield, J.C. Interactions of Corticosterone with Feeding, Activity and Metabolism in Passerine Birds. *Ornis Scand.* **1992**, *23*, 355. [[CrossRef](#)]
72. Tshipoura, N.; Scanes, C.G.; Burger, J. Corticosterone and growth hormone levels in shorebirds during spring and fall migration stopover. *J. Exp. Zool.* **1999**, *284*, 645–651. [[CrossRef](#)]
73. Crossin, G.T.; Trathan, P.N.; Phillips, R.A.; Gorman, K.B.; Dawson, A.; Sakamoto, K.Q.; Williams, T.D. Corticosterone predicts foraging behavior and parental care in Macaroni penguins. *Am. Nat.* **2012**, *180*, E31–E41. [[CrossRef](#)]
74. Nasir, A.; Moudgal, R.P.; Singh, N.B. Involvement of corticosterone in food intake, food passage time and in vivo uptake of nutrients in the chicken (*Gallus domesticus*). *Br. Poult. Sci.* **1999**, *40*, 517–522. [[CrossRef](#)]
75. Koch, K.A.; Wingfield, J.C.; Buntin, J.D. Glucocorticoids and parental hyperphagia in ring doves (*Streptopelia risoria*). *Horm. Behav.* **2002**, *41*, 9–21. [[CrossRef](#)]
76. Beuving, G.; Vonder, G.M. The influence of ovulation and oviposition on corticosterone levels in the plasma of laying hens. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1981**, *44*, 382–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Buntin, J.D. Neural and Hormonal Control of Parental Behavior in Birds. In *Parental Care: Evolution, Mechanisms, and Adaptive Significance*; Rosenblatt, J.S., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 1996; pp. 161–213, ISBN 9780120045259.
78. Silver, R.; Reboulleau, C.; Lehrman, D.S.; Feder, H.H. Radioimmunoassay of plasma progesterone during the reproductive cycle of male and female ring doves (*Streptopelia risoria*). *Endocrinology* **1974**, *94*, 1547–1554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Sockman, K.W.; Schwabl, H. Daily estradiol and progesterone levels relative to laying and onset of incubation in canaries. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1999**, *114*, 257–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Takahashi, T.; Kawashima, M. Mesotocin increases the sensitivity of the hen oviduct uterus to arginine vasotocin. *Poult. Sci.* **2008**, *87*, 2107–2111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Connolly, P.B.; Callard, I.P. Steroids modulate the release of luteinizing hormone from quail pituitary cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1987**, *68*, 466–472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Goutte, A.; Angelier, F.; Chastel, C.C.; Trouvé, C.; Moe, B.; Bech, C.; Gabrielsen, G.W.; Chastel, O. Stress and the timing of breeding: Glucocorticoid-luteinizing hormones relationships in an arctic seabird. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2010**, *169*, 108–116. [[CrossRef](#)]
83. Etches, R.J.; Croze, F. Plasma concentrations of LH, progesterone, and corticosterone during ACTH- and corticosterone-induced ovulation in the hen (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **1983**, *50*, 359–365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Etches, R.J.; Petite, J.N.; Anderson-Langmuir, C.E. Interrelationships between the hypothalamus, pituitary gland, ovary, adrenal gland, and the open period for LH release in the hen (*Gallus domesticus*). *J. Exp. Zool.* **1984**, *232*, 501–511. [[CrossRef](#)]
85. Cotter, P.F. An examination of the utility of heterophil-lymphocyte ratios in assessing stress of caged hens. *Poult. Sci.* **2015**, *94*, 512–517. [[CrossRef](#)]
86. Matur, E.; Eraslan, E.; Akyazi, I.; Ergul Ekiz, E.; Eseceli, H.; Keten, M.; Metiner, K.; Aktaran Bala, D. The effect of furnished cages on the immune response of laying hens under social stress. *Poult. Sci.* **2015**, *94*, 2853–2862. [[CrossRef](#)]

87. Davis, A.K.; Maney, D.L.; Maerz, J.C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: A review for ecologists. *Funct. Ecol.* **2008**, *22*, 760–772. [[CrossRef](#)]
88. Scanes, C.G. Blood. Chapter 10. In *Sturkie's Avian Physiology*, 6th ed.; Scanes, C.G., Sturkie, P.D., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2015; pp. 167–191, ISBN 9780124071605.
89. Ramage-Healey, L.; Romero, L.M. Daily and seasonal variation in response to stress in captive starlings (*Sturnus vulgaris*): Glucose. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2000**, *119*, 60–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Carpenter, J.W.; Marion, C.J. (Eds.) *Exotic Animal Formulary*, 5th ed.; Saunders: St. Louis, MO, USA, 2018; ISBN 9780323444507.
91. Zaytsoff, S.J.M.; Brown, C.L.J.; Montana, T.; Metz, G.A.S.; Abbott, D.W.; Uwiera, R.R.E.; Inglis, G.D. Corticosterone-mediated physiological stress modulates hepatic lipid metabolism, metabolite profiles, and systemic responses in chickens. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 19225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Cray, C.; Gautier, D.; Harris, D.J.; Arheart, K.L. Changes in clinical enzyme activity and bile acid levels in psittacine birds with altered liver function and disease. *J. Avian Med. Surg.* **2008**, *22*, 17–24. [[CrossRef](#)]
93. Hu, Y.; Sun, Q.; Liu, J.; Jia, Y.; Cai, D.; Idriss, A.A.; Omer, N.A.; Zhao, R. In ovo injection of betaine alleviates corticosterone-induced fatty liver in chickens through epigenetic modifications. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 40251. [[CrossRef](#)]
94. Hu, Y.; Sun, Q.; Hu, Y.; Hou, Z.; Zong, Y.; Omer, N.A.; Abobaker, H.; Zhao, R. Corticosterone-Induced Lipogenesis Activation and Lipophagy Inhibition in Chicken Liver Are Alleviated by Maternal Betaine Supplementation. *J. Nutr.* **2018**, *148*, 316–325. [[CrossRef](#)]
95. Häffelin, K.E.; Lindenwald, R.; Kaufmann, F.; Döhring, S.; Spindler, B.; Preisinger, R.; Rautenschlein, S.; Kemper, N.; Andersson, R. Corticosterone in feathers of laying hens: An assay validation for evidence-based assessment of animal welfare. *Poult. Sci.* **2020**, *99*, 4685–4694. [[CrossRef](#)]

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.

Supplementary Material

Table S 1. Information on the experimental phase

Group	Test series	Date	Tested hens	Remarks
1	1	2021/07/21-24	3 and 4	Problems with microphone recordings, 07/23 from 10.38 am to 12.23 pm no video recording because of insufficient storage space
2	2	2021/07/28-31	1 and 2	Problems with microphone recordings, 07/28-30 hen 1 audio not recorded -> change of microphone for hen 1 at 07/30, 12.35 pm
2	3	2021/08/12-15	6 and 8	Installation of additional external microphone in the aviary to supplement audio recordings in case of failing
3	4	2021/08/18-21	5 and 7	/
3	5	2021/09/29-10/02	11 and 12	/
3	6	2021/10/06-09	9 and 10	/

Table S 2. Observations at corticosterone peaks

Hen (number)	sampling point (number)	date	time	CORT peaks associated with dominance behavior or distress		time span catch to blood sampling (minutes)	time span between hormone peaks (hrs.min)
				Yes (< 30 minutes before blood sampling)	no not clearly visible or > 30 minutes prior blood sampling		
1	1	21/07/28	12.07 pm	x		no recording	15.55
	5	21/07/29	04.02 am	x		6	11.56
	8	21/07/29	03.58 pm	x		4	11.58

2	11	21/07/30	03.56 am		x		2	12.01
	14	21/07/30	03.57 pm		x		3	8.03
	16	21/07/31	12.00 am		x		2	7.58
	18	21/07/31	07.58 am		x		2	
7	1	21/07/28	12:11 pm		x		no recording	23.52
	7	21/07/29	12:03 pm	x			5	12.04
10	10	21/07/30	12.07 am		x		5	12.01
	13	21/07/30	12.08 pm	x			6	
3	2	21/07/21	04.02 pm		x		4	16.06
	6	21/07/22	08.08 am		x		4	15.49
	10	21/07/22	11.57 pm	x			5	16.01
	14	21/07/23	03.58 pm		x		3	11.59
4	17	21/07/24	03.57 am	x			2	
	2	21/07/21	04.12 pm		x		3	11.49
	5	21/07/22	04.01 am		x		4	7.54
7	7	21/07/22	11.55 am		x		2	36.04
	16	21/07/23	11.59 pm	x			4	
5	1	21/08/18	11.54 am		x		2	16.04
	5	21/08/19	03.58 am		x		3	8.00
	7	21/08/19	11.58 am	x			2	8.00
9	9	21/08/19	07.58 pm		x		2	8.03
	11	21/08/20	04.01 am		x		5	15.57
	15	21/08/20	07.58 pm		x		3	12.02

(repeatedly being pecked and chased from food, 20x between 08.00 am and 12.00 pm)

(repeatedly being pecked and chased from food, 16x between 07.40 am and 11.30 am)

(caught for blood sampling)

(caught for blood sampling)

(stress call 4 h ago)

(2x being pecked at 09.41 am and 10.31 am)

(caught for blood sampling)

(10.25 am chased from food)

		(4x being pecked between 09.10 am and 05.29 pm)			
6	18	21/08/21	08.00 am	x 1	
	2	21/08/12	03.54 pm	x 2	
	5	21/08/13	03.59 am	x 6	
	9	21/08/13	07.59 pm	x 4	
	12	21/08/14	08.00 am	x 2	
7	17	21/08/15	03.58 am	x 3	
	1	21/08/18	11.57 am	x 1	
	4	21/08/19	12.03 am	x 2	
	9	21/08/19	08.05 pm	x 3	
	13	21/08/20	12.02 pm	x 3	
(2x being pecked/chased at 09.39 am and 10.54 am)					
8	17	21/08/21	04.04 am	x 2	
	1	21/08/12	12.01 pm	x 2	
	6	21/08/13	08.14 am	x 3	
	11	21/08/14	04.02 am	x 2	
	14	21/08/14	04.04 pm	x 2	
(03.15/03.16 pm being pecked)					
9	16	21/08/15	12.02 am	x 2	
	18	21/08/15	08.04 am	x 2	
	2	21/10/06	03.57 pm	x 2	
	5	21/10/07	04.01 am	x 7	
	(caught for blood sampling)				
10	8	21/10/07	03.54 pm	x 6	
	13	21/10/08	11.58 am	x 2	
	15	21/10/08	07.56 pm	x 2	
	(caught for blood sampling)				
	1	21/10/06	12.07 pm	x 2	
11	4	21/10/07	12.05 am	x 3	
	18	21/10/09	08.00 am	x 2	
	(caught for blood sampling)				
1	21/09/29	12.04 pm	x 4	11.49	

(11.08 am fallen from ventilation system)

4	21/09/29	11.53 pm	x	2	12.07	
7	21/09/30	12.00 pm	x	2	11.56	
10	21/09/30	11.56 pm	x	4	12.04	
13	21/10/01	12.00 pm	x	4	12.03	
16	21/10/02	12.03 am	x	5		
12	1	21/09/29	12.13 pm	x	3	15.44
	5	21/09/30	03.57 am	x	2	8.06
	7	21/09/30	12.03 pm	x	1	8.01
	9	21/09/30	08.04 pm	x	5	12.01
	12	21/10/01	08.05 am	x	2	7.58
	14	21/10/01	04.03 pm	x	3	11.59
	17	21/10/02	04.02 am	x	2	

Table S 3. Summarized blood corticosterone measurements (pg/ml), descriptive statistics of all hens for each time point, excl. first measurement of each hen

	12.00 am	04.00 am	08.00 am	12.00 pm	04.00 pm	08.00 pm
Min.	530.1	485.3	479.3	486.8	504.6	494
1st Qu.	1210.9	1293.6	1172.4	946.4	1116	726.7
Median	2330.4	2083	1719.8	2661.6	2791.3	1737.1
Mean	2628	2469.4	1975.2	3101.1	3030.5	2241
3rd Qu.	3556.5	2684.5	2520.8	4581.4	4776.4	2966.7
Max.	7950.8	9593.6	4919.6	9958.9	7522.5	8163.5
SD	1852	1957.5	1161.2	2467.3	2112.7	1921.8

Table S 4. Total blood corticosterone measurements (pg/ml) of all hens for all sampling points

Sampling Point	Hen 01	Hen 02	Hen 03	Hen 04	Hen 05	Hen 06	Hen 07	Hen 08	Hen 09	Hen 10	Hen 11	Hen 12
1 (12.00 pm)	11337.88	37068.27	2307.67	2335.83	3336.32	1995.83	4404.87	8782.14	3994.85	9788.77	7800.25	12106.48
2 (04.00 pm)	5095.93	6651.09	3963.98	3264.00	1861.96	5698.87	779.25	568.70	4722.59	3181.24	1393.52	7522.46
3 (08.00 pm)	7630.30	3290.02	2764.11	1870.20	526.28	3469.83	622.02	522.23	2837.19	493.97	1603.92	4774.27
4 (12.00 am)	7950.79	1422.17	3311.44	2493.69	1646.19	4297.83	2350.36	706.56	1219.75	1184.26	3049.51	3538.03
5 (04.00 am)	8014.69	2087.32	4024.38	4165.21	2319.44	5200.75	1305.51	1161.32	4224.67	490.12	1491.80	4351.45
6 (08.00 am)	1422.68	4919.63	4181.82	3014.24	716.10	4268.71	1224.65	3975.19	1654.56	479.26	1485.59	2394.46
7 (12.00 pm)	1917.62	5563.41	3011.64	9958.90	939.27	2311.54	514.94	3200.94	3468.19	486.78	5529.48	5739.68
8 (04.00 pm)	5251.65	5050.30	2886.05	4208.96	529.37	2892.52	813.75	1069.49	4023.79	504.59	1094.46	1844.51
9 (08.00 pm)	571.23	3616.93	1057.69	2246.24	1986.00	5623.81	3849.95	531.61	3370.76	498.45	1213.69	8163.50
10 (12.00 am)	6087.10	6193.54	4925.26	2394.54	1232.09	3611.79	530.07	998.15	2872.99	547.99	5195.56	2310.52
11 (04.00 am)	9593.64	1512.50	2466.94	2278.06	2186.01	940.52	515.66	2683.63	1804.58	485.27	1897.98	2449.77
12 (08.00 am)	2901.22	1610.55	1474.27	2254.15	1840.60	1947.31	2009.66	2492.91	1001.00	507.69	872.75	3574.64
13 (12.00 pm)	3236.69	6990.52	1434.59	1780.71	948.77	1947.37	4265.40	519.34	3536.34	529.36	5862.60	732.78
14 (04.00 pm)	4937.92	6844.06	2696.47	1822.47	539.29	1740.00	1353.55	2251.54	1123.18	573.67	3636.83	6705.21
15 (08.00 pm)	2858.89	2769.02	620.16	1969.05	1155.55	957.40	761.56	523.96	1562.09	918.35	2367.78	1077.83
16 (12.00 am)	3437.97	1485.78	2385.01	3653.27	852.16	1638.99	1374.29	1159.98	858.71	920.72	5384.59	1386.98
17 (04.00 am)	2686.96	1257.69	3322.05	2204.42	1117.57	2314.46	1787.44	753.24	517.85	1329.65	1876.19	2078.60
18 (08.00 am)	3460.48	1015.70	2604.49	1237.26	1785.03	1345.90	582.68	1826.50	554.61	1926.23	998.68	1544.89

Table S 5. Blood corticosterone measurements (pg/ml), descriptive statistics for each hen, excl. first measurement of each hen

	Hen 01	Hen 02	Hen 03	Hen 04	Hen 05	Hen 06	Hen 07	Hen 08	Hen 09	Hen 10	Hen 11	Hen 12
Min.	571.2	1016	620.2	1237	526.3	940.5	514.9	519.3	517.9	479.3	872.7	732.8
1st Qu.	2858.9	1513	2385	1969	852.2	1740	622	568.7	1123.2	494	1393.5	1844.5
Median	3460.5	3290	2764.1	2278	1155.5	2314.5	1224.7	1069.5	1804.6	529.4	1876.2	2449.8
Mean	4532.7	3664	2772.4	2989	1304.8	2953.4	1449.5	1467.4	2314.9	885.7	2644.4	3540.6
3rd Qu.	6087.1	5563	3322	3264	1840.6	4268.7	1787.4	2251.5	3468.2	920.7	3636.8	4774.3
Max.	9593.6	6991	4925.3	9959	2319.4	5698.9	4265.4	3975.2	4722.6	3181.2	5862.6	8163.5
SD	2592.4	2214.4	1161.8	1983.7	606.3	1593.4	1128.3	1077.9	1390.7	716.4	1779.8	2316.5

Table S 6. Shapiro-Wilk-Test for summarized blood corticosterone measurements of all hens for each time point, excl. first measurement of each hen

Time point	W	p-value
\$'12.00 am'	0.88898	0.001728
\$'04.00 am'	0.78671	8.963e-06
\$'08.00 am'	0.9201	0.01267
\$'12.00 pm'	0.89295	0.0153
\$'04.00 pm'	0.91833	0.01125
\$'08.00 pm'	0.82316	4.863e-05

Table S 7. Robust linear mixed model fit by DASTau for summarized blood corticosterone measurements (pg/ml) of all hens for each time point, excl. first measurement of each hen

Formula: value ~ time + (1 | Hen)

Data: CORT

Random effects:

Groups	Name	Std.Dev.			
Hen	(Intercept)	1016			
Residual		1484			
Number of obs: 204, groups: Hen, 12					
Fixed Effects:					
(Intercept)	time 2(04.00 am)	time 3(08.00 am)	time 4(12.00 pm)	time 5(04.00 pm)	time 6(08.00 pm)
2498.4	-223.3	-557.3	287.9	375.5	-446.1

Table S 8. Estimated marginal means (emmeans) of summarized blood corticosterone measurements (pg/ml) of all hens for each time point, excl. first measurement of each hen, confidence level used: 0.95

time	emmean	SE	df	asympt. LCL	asympt. UCL
1 (12.00 am)	2498	393	Inf	1727	3270
2 (04.00 am)	2275	393	Inf	1504	3046
3 (08.00 am)	1941	393	Inf	1170	2712
4 (12.00 pm)	2786	432	Inf	1939	3634
5 (04.00 pm)	2874	393	Inf	2103	3645
6 (08.00 pm)	2052	393	Inf	1281	2824

Table S 9. Contrasts of emmeans of summarized blood corticosterone measurements (pg/ml) of all hens for each time point, excl. first measurement of each hen, confidence level used: 0.95

contrast	estimate	SE	df	z.ratio	p.value
1 (12.00 am) - 2 (04.00 am)	223.3	359	Inf	0.623	0.5336
1 (12.00 am) - 3 (08.00 am)	557.3	359	Inf	1.554	0.1202
1 (12.00 am) - 4 (12.00 pm)	-287.9	401	Inf	-0.718	0.4728
1 (12.00 am) - 5 (04.00 pm)	-375.5	359	Inf	-1.047	0.2952
1 (12.00 am) - 6 (08.00 pm)	446.1	359	Inf	1.244	0.2135
2 (04.00 am) - 3 (08.00 am)	334	359	Inf	0.931	0.3517
2 (04.00 am) - 4 (12.00 pm)	-511.1	401	Inf	-1.275	0.2024
2 (04.00 am) - 5 (04.00 pm)	-598.7	359	Inf	-1.669	0.0951
2 (04.00 am) - 6 (08.00 pm)	222.9	359	Inf	0.621	0.5343
3 (08.00 am) - 4 (12.00 pm)	-845.2	401	Inf	-2.108	0.0351
3 (08.00 am) - 5 (04.00 pm)	-932.7	359	Inf	-2.601	0.0093
3 (08.00 am) - 6 (08.00 pm)	-111.1	359	Inf	-0.310	0.7566
4 (12.00 pm) - 5 (04.00 pm)	-87.6	401	Inf	-0.218	0.8271
4 (12.00 pm) - 6 (08.00 pm)	734	401	Inf	1.830	0.0672
5 (04.00 pm) - 6 (08.00 pm)	821.6	359	Inf	2.291	0.0220

Table S 10. Correlation amount distress-related peaks with blood sampling time

Distress	Blood sampling time (min)						
	1	2	3	4	5	6	7
Yes	0	4	0	2	2	1	1
No	3	21	9	7	4	3	0
Uncertain	0	2	3	0	0	0	0

Table S 11. Pearson's Chi-squared test, Correlation distress-related peaks with blood sampling time

X-squared	df	p-value
15.526	12	0.2139

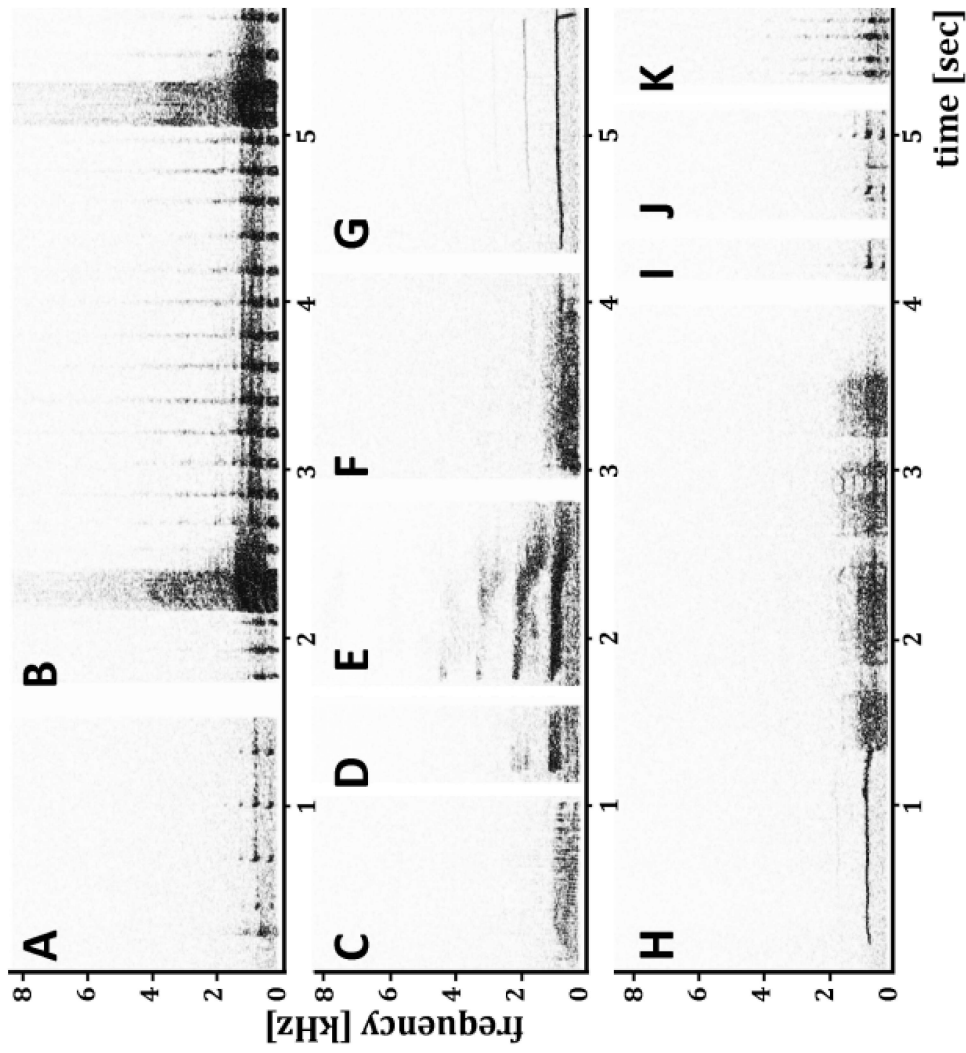


Figure S 1. Spectrograms of call types: a) food calls, b) gavel calls, c) contentment call, d) short scream, e) long scream, f) growling, g) whining, h) mixed call, i) single cluck, j) double cluck, k) fast clucks

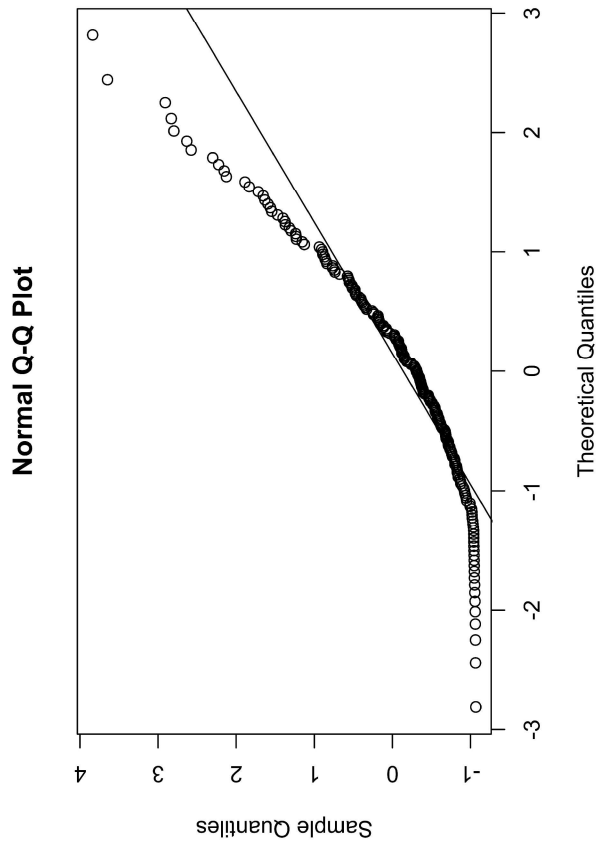


Figure S 2. Q-Q plot for total corticosterone measurements, excl. first measurement of each hen

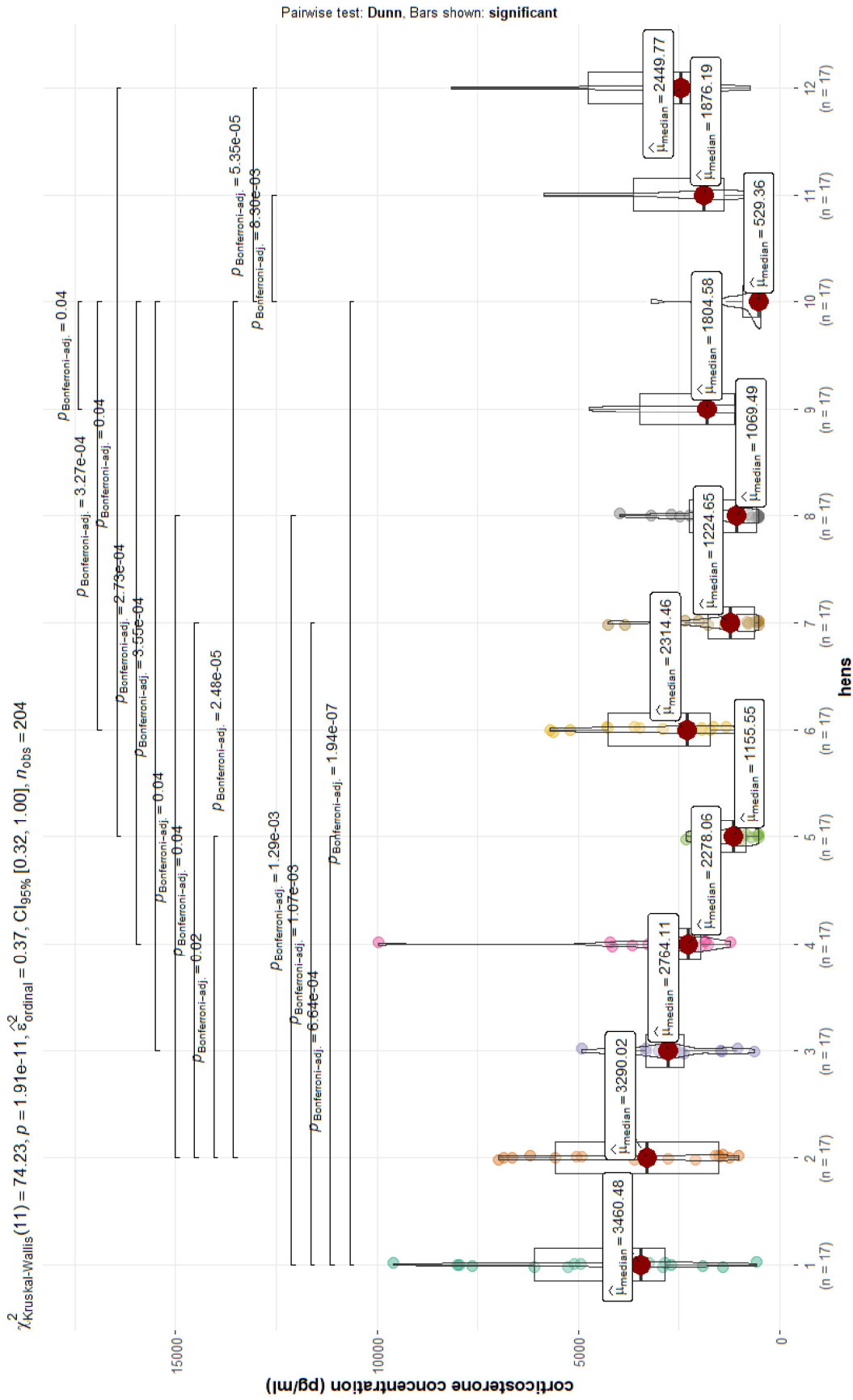


Figure S 3. Kruskal Wallis rank sum test for Corticosterone measurements of all hens, excl. first measurement of each hen

CORT effect plot without 1. measurement, hens 1-4

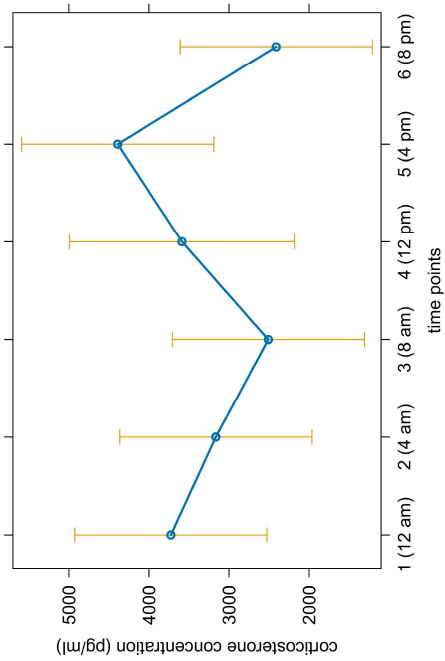


Figure S 4. Corticosterone effect plot (pg/ml) for hens 01 to 04, excl. first measurement of each hen

CORT effect plot without 1. measurement, hens 5-8

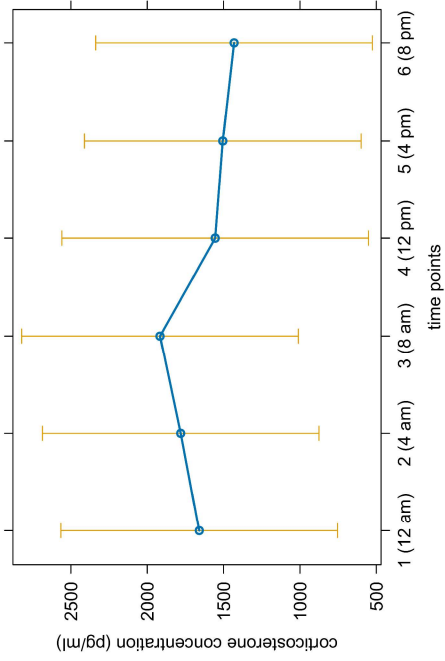


Figure S 5. Corticosterone effect plot (pg/ml) for hens 05 to 08, excl. first measurement of each hen

CORT effect plot without 1. measurement, hens 9-12

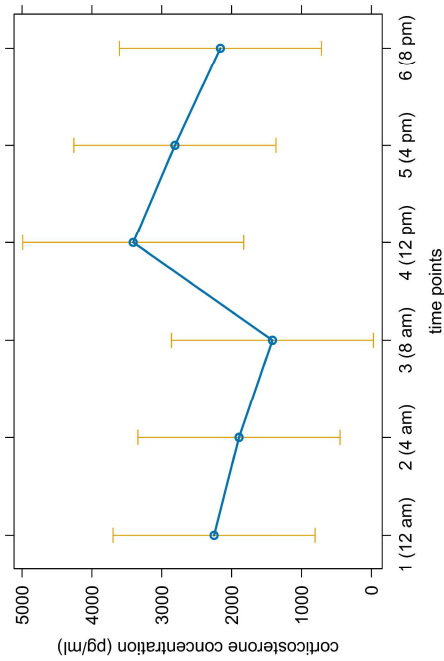


Figure S 6. Corticosterone effect plot (pg/ml) for hens 09 to 12, excl. first measurement of each hen

VI. Material und Methoden:

VI.1 Tierexperimentelle Vorgehensweise

Der Tierversuch wurde von der Regierung von Oberbayern unter dem Geschäftszeichen ROB-55.2-2532.Vet_02-20-161 im Februar 2021 genehmigt. Die Genehmigung beinhaltete einen Vorversuch mit 12 Legehennen zur Ermittlung einer statistisch signifikanten Tierzahl für die Erstellung eines zirkadianen Hormonprofils. Die 12 für den Versuch genehmigten Legehennen wurden in drei Gruppen à vier Tieren gehalten. Die Zielsetzung war, über drei Tage verteilt 18 Mal Blut zu entnehmen für die Messung des Hormons CORT im Blut zur Erstellung eines zirkadianen Hormonprofils und die Testung der dauerhaften Durchgängigkeit des Venenkatheters über die Verweilzeit.

Der praktische Teil dieser Studie erstreckte sich über einen gesamten Zeitraum vom 21.07.2021 bis zum 09.10.2021.

VI.2 Versuchstiere, Haltung und Fütterung

Für den Versuch standen 12 Legehennen der Zuchtlinie Lohmann Brown (LB) zur Verfügung. Alle Tiere wurden verwendet. Die Legehennen kamen als Junghennen aus der Geflügelzucht der LSL Rhein-Main Geflügelvermehrungsbetriebe GmbH, Verkaufsniederlassung Gut Heinrichsruh in Berglern. Sie stammten aus zwei verschiedenen Aufzuchten und wurden daher mit einem Alter zwischen 18 und 19 Lebenswochen in den Versuchstierstall der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische an der Tierärztlichen Fakultät München eingestallt, wo sie bis zu dem Mindestalter von 24 Lebenswochen für den Versuch weiter aufgezogen wurden.

Der Versuchstierstall besaß eine Unterdrucklüftung, war aber nicht klimatisiert. Dementsprechend betrug die Raumtemperatur während der Versuchsphase durchschnittlich 22,6 °C, die relative Luftfeuchte lag im Mittel bei 52 %. Es wurde ein Hell-Dunkel-Lichtregime von 10L:14D verwendet (hell ab 7:00 Uhr MEZ bzw. 8:00 Uhr MESZ und dunkel ab 17:00 Uhr MEZ bzw. 18:00 Uhr MESZ). Da die Räume Tageslichtfenster hatten, kam es zu sonnenaufgangs- und sonnenuntergangsabhängig längeren Lichtphasen im Stall: 15L:9D (Juli), 14L:10D (August) und 11L:13D (September/Oktober). Auf

Augenhöhe der Tiere in drei Ebenen gemessen betrug die Lichtintensität in der Mitte der ausgestalteten Voliere 20 bis 30 Lux und auf den Sitzstangen 50 bis 65 Lux. Für Legehennen gibt es derzeit keine gesetzlichen Vorgaben in der TierSchNutzV, Abschnitt 3 (2001) bezüglich der Beleuchtungsintensität während der Photophase, die Empfehlung in Bezug auf Haushühner der Art *Gallus gallus* des Europarats, Artikel 14 (1995a) liefert jedoch eine Orientierungsgrundlage.

Die Tiere wurden für die Aufzucht in Vierergruppen gehalten in ausgestalteten Volieren mit 5,44 m² oder 11,21 m² Grundfläche und einer Deckenhöhe von 2,4 m, welche den Vorgaben der TierSchNutzV, Abschnitt 3, §§ 13, 13a (2001) entsprachen (*Abbildungen 1 und 2*). Demnach standen jedem Tier je nach Gruppe 1,36 m² bzw. 2,8 m² nutzbare Bodenfläche zur Verfügung. Für die Versuchsdurchführung wurde jede Vierergruppe in demselben Raum mit 11,21 m² Grundfläche und einer Deckenhöhe von 2,4 m untergebracht, welcher mit einer Überwachungskamera, einer Antenne für die Übertragung der Audioaufnahmen und einem zusätzlichen Mikrofon versehen war. Auf die technische Ausstattung wird später genauer eingegangen.

Die Sitzstangen für die Legehennen waren aus Holz und besaßen zwei unterschiedliche Höhen, damit die Tiere nachts erhöht aufbaumen konnten. Die Länge betrug auf jeder Höhe 2 m. Zur Wasserversorgung wurde eine 5 l Stülptränke (Kunststofftränke mit Standfüßen, 5 Liter, © Albert Kerbl GmbH, Buchbach, Deutschland) verwendet, für das Futter ein Futtertrog mit einem Fassungsvermögen von 4 l (Futterautomat mit Standfüßen, 4 Liter, © Albert Kerbl GmbH, Buchbach, Deutschland). Den Legehennen wurden pro Gruppe zwei Legenester (Legenest für Hühner aus Metall und Kunststoff, 2 Abteile, © Albert Kerbl GmbH, Buchbach, Deutschland), jeweils mit den Maßen 52,5 x 27 x 42,5 cm, zur Verfügung gestellt. Als Sandbad wurden mit Quarzsand gefüllte Kunststoffboxen mit den Maßen 54,2 x 37,2 x 15,5 cm genutzt. Das Beschäftigungsmaterial bzw. Enrichment bestand aus einem 20 kg Luzerneballen (Compact Luzerne für Geflügel, 20 kg, Grasdrogerij Hartog B.V., Lambertschaag, Niederlande) und einem 5 kg Pickblock (Pickblock MEDIUM, Crystalux® Products GmbH, Münster, Deutschland). Zur Abwechslung wurde wöchentlich ein mit Körnerfutter gefüllter Futterball angeboten. Im Sommer wurden zusätzlich Nuss- oder Obstbaumzweige zur Verfügung gestellt. Die Einstreu bestand aus Strohpellets mit einer Körnung von 8 mm (Strohpellets Porta Pellis, 60 l, Schulze Heimtierbedarf GmbH, Porta Westfalica, Deutschland).

Die Legehennen wurden täglich mit frischem Futter und Wasser versorgt, auch die Temperatur und Luftfeuchte wurden täglich kontrolliert und für die Versuchszeit dokumentiert. Einmal pro Woche wurden die Filter im Raum gewechselt und der Kot aus der Einstreu entfernt. Alle vier Wochen wurde die Einstreu vollständig erneuert und der Raum gründlich mit Wasser ausgespritzt. Die Wassertränken wurden täglich gereinigt, die Futtertröge alle vier Wochen oder bei Bedarf früher. Zur Gewichtsüberwachung wurden die Hühner täglich palpatorisch kontrolliert und bei der Einstallung sowie vor dem Versuchsbeginn gewogen.

Wasser und Futter standen den Versuchstieren ad libitum zur Verfügung. Gefüttert wurden zu 2/3 der Ration Futtermehl (Legemehl Premium, Mifuma, Mischfutter Werke Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland) und zu 1/3 Körnerfutter (Geflügelkörner Premium, Mifuma, Mischfutter Werke Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland), welches Muschelgrit enthielt. Zusätzlich wurde täglich Obst oder Gemüse angeboten, einmal die Woche auch lebende oder getrocknete Mehlwürmer. Als Belohnung für Trainingseinheiten wurden Körnerfutter, Mehlwürmer oder Dosenmais verwendet.



Abbildung 1. Voliere der Versuchstiere mit Enrichment



Abbildung 2. Versuchstiere (Lohmann Brown Legehennen) in der Voliere

VI.3 Handhabung und Training

Die Versuchstiere wurden bereits ab der Einstellung an den regelmäßigen Kontakt mit Menschen gewöhnt. Der Stallraum wurde täglich mindestens einmal zur Versorgung der Tiere mit Futter und Wasser betreten. Nach einer einwöchigen Eingewöhnungszeit wurden die Junghennen langsam mit Futterbelohnungen an die Annäherung von Menschen und das Fressen aus der Hand gewöhnt. Sobald dies möglich war, wurden die Hühner täglich kurz auf den Arm genommen, um sie an die Handhabung für die Versuche zu gewöhnen (Korbel et al. 2012). Ebenso wurden ihnen die Transportboxen auf dem Boden gezeigt, in welchen sie für die Versuchsdurchführung in den Operationsraum der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische verbracht werden sollten.

Nach einer Eingewöhnungszeit von mindestens einer Woche wurde mit dem Training für den Versuch begonnen. Das Training beinhaltete die Gewöhnung an das Tragen einer Warnweste für Hühner und eines Flügelverbands. Verwendet wurden gelbe Warnwesten für Hühner der Firma Omlet Ltd. (Warnweste für Hühner, gelb, Omlet Ltd., Banbury, England). Zu Beginn wurde eine gelbe Warnweste im Raum aufgehängt, damit sich die Tiere an den Gegenstand gewöhnen konnten. Nach ein paar Tagen wurde ihnen die Weste unter Berücksichtigung der individuellen Reaktionen für wenige Minuten angezogen (*Abbildung 3*). Die Tragedauer wurde immer weiter bis zu einer Dauer von fünf Stunden gesteigert unter Sichtkontrolle des Verhaltens. Sobald die Hühner an das Tragen der Warnweste gewöhnt waren, wurde ihnen der zusätzliche Flügelverband angelegt während des Trainings. Zu den anfänglichen Abwehrreaktionen nach dem Anlegen der Warnweste gehörten ein andauernder Versuch das Gefieder unter der Weste zu putzen, ein Bepicken der Weste sowie Ducken und Rückwärtslaufen. Nach etwa vier Trainingseinheiten ließ das anfängliche Abwehrverhalten der Tiere deutlich nach. Die Hennen wurden bis zum Versuchsende in der Vierergruppe belassen, in welcher sie bereits zu Beginn aufgestellt wurden.



Abbildung 3. Lohmann Brown Legehennen mit Omlet Ltd. Warnweste für Hühner

VI.4 Versuchsaufbau

Für die Audio- und Videoaufnahmen wurde ein technisches Setup innerhalb sowie vor der ausgestalteten Voliere aufgebaut. In der Voliere befanden sich zentral eine Überwachungskamera mit einem Lichtsignal zur Synchronisation mit den Audioaufnahmen sowie eine Antenne für den Empfang der Audioaufnahmen. Ab der dritten Versuchsdurchführung wurde ein separates Mikrofon (Behringer C-2 Kondensatormikrofon, Behringer®, Penang, Malaysia) an der Volierenwand zur separaten Lautaufzeichnung der Hühner hinzugefügt.

Zur kontinuierlichen Videoüberwachung wurde eine Überwachungskamera der Firma GeoVision verwendet. Es handelte sich dabei um das Modell GV-FER5701 (GV-FER5701 5MP H.265 Low Lux WDR Pro IR Fisheye Rugged IP Camera, © GeoVision Inc., Taipei, Taiwan), eine 5 Megapixel Fisheye-Kamera mit wahlweise 360° oder 180° Panorama-Aufnahme und integriertem Mikrofon zur Audioaufnahme. Die Kamera wurde über ein CAT 6-LAN-Netzwerkkabel (inLine® 5m LAN Kabel Cat6 Patchkabel Gelb PIMF SFTP, Intos Electronic AG, Gießen, Deutschland) mit einem Netzteil (UniFi® PoE Netzteil 24W LAN Einspeisenetzteil 230V auf PoE 48V 10/100/1000Mbit Gigabit, Ubiquiti Inc., New York City, Vereinigte Staaten von Amerika) verbunden. Über ein weiteres CAT 6-LAN-Netzwerkkabel (inLine® 2m LAN Kabel Cat6 Patchkabel Gelb PIMF SFTP, Intos Electronic AG, Gießen, Deutschland) wurden die Daten in ein PoE-Switch (TP-Link® LAN RJ45 Switch 5Port Desktop SF 10/100Mbit mit 230VAC-Netzteil, TP-Link Corporation Limited, Tsim Sha Tsui, Hong Kong) eingespeist und anschließend mit einem dritten CAT 6-LAN-Netzwerkkabel (inLine® 2m LAN Kabel Cat6 Patchkabel Gelb PIMF SFTP, Intos Electronic AG, Gießen, Deutschland) an ein Notebook weitergeleitet. Über das Notebook konnte die Kamera live überwacht und die Aufnahme gesteuert werden. Die Daten wurden vorübergehend direkt auf einer externen Festplatte (WD® WDElements™ Festplatte, 2 TB HDD, Western Digital Technologies, Inc., San José, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika) gespeichert. Die eingestellte Auflösung der GV-FER5701 betrug 2592 x 1944 Pixel bei 30 fps (60Hz). Zudem wurde die maximal mögliche Videolänge von 5 Minuten ausgewählt. Die Videoaufnahmen beinhalteten Bild und Ton.

Die Lautäußerungen der einzelnen Hühner wurden mit kleinen, kabellosen Audiotransmittern aufgenommen. Die Audiotransmitter wurden am Max-Planck-Institut für Biologische Intelligenz (in Gründung), Seewiesen entwickelt und gefertigt.

Sie bestanden aus einer Platine mit einer Spule, einem Mikrofon (FG-23329-P07, Knowles Electronics, LLC., Itasca, Illinois, Vereinigte Staaten von Amerika) und einer Knopfzelle (analog Duracell® Hearing Aid 13, PR 48, 1,45 V Zinc Air, Duracell Germany GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) zur Stromversorgung (*Abbildungen 4 und 5*). Von außen waren sie mit einem Silikon-Schrumpfschlauch überzogen. Das Gewicht der Audiotransmitter lag bei 1,4 g inklusive Batterie und bei 0,59 g ohne Batterie.

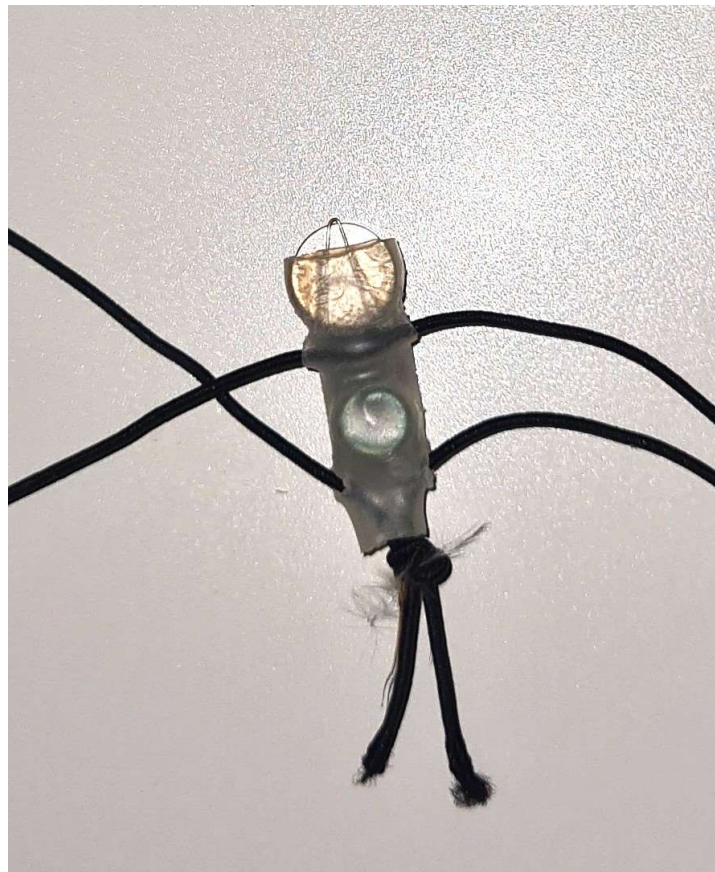


Abbildung 4. Miniatur-Mikrofon, Eigenbau des Max-Planck-Instituts für Biologische Intelligenz, in Gründung, Seewiesen



Abbildung 5. Größenvergleich des Miniatur-Mikrofons mit einer 1 Cent-Münze

Um die Mikrofone auf dem Rücken der Hühner zu fixieren wurden elastische Bänder genutzt, die über die Beine gezogen wurden. Die Öffnung der Mikrofone zeigte zum Körper der Tiere, damit die Vokalisationen besser aufgenommen werden konnten. Zum Empfang der Aufnahmen wurde eine gekreuzte Yagi-Uda-Antenne (Kreuzdipol 300 für 300 MHz, Winkler-Spezialantennen, Annaberg, Deutschland) verwendet, welche zentral im Raum in einer Höhe von 2,4 m aufgehängt wurde (*Abbildung 6*). Zudem war ein Verstärker (67237 – Mini coaxial cable amplifier DVB-T/SAT 18 dB, Goobay, Wentronic GmbH, Braunschweig, Deutschland) angebracht. Die Länge der Antenne inklusive des Verstärkers betrug 41,5 cm, sodass sich das untere Ende der Antenne ca. 1,98 m über dem Boden befand. Die Übertragung der Signale erfolgte über Wide-Frequenzmodulation (WFM), die Sendefrequenz der Mikrofone lag zwischen 291,8 und 321 MHz.



Abbildung 6. Technik-Setup in Voliere: Yagi-Antenne, Überwachungskamera und zusätzliches Mikrofon an der Wand

Über ein RG6-Koaxialkabel wurde die Antenne über einen Verteilverstärker (axing® TVS 14-00 CATV-Verteilverstärker, Axing AG, Ramsen, Schweiz) mit vier Receivern (AOR AR-8600MK2 Breitbandempfänger 100 kHz bis 3000 MHz; AOR, Ltd., Tokyo, Japan) verbunden, die wiederum an einem Audio/MIDI Interface (M-Audio Fast Track Ultra 8R, M-Audio, Cumberland, Rhode Island, Vereinigte Staaten von Amerika) angeschlossen waren (Abbildung 7). Das Empfangssignal der vier Receiver wurde regelmäßig manuell geprüft, da dies in diesem Einzelfall effektiver war als der Einsatz eines Oszilloskops. Das Interface synchronisierte alle eingehenden Aufnahmen zeitlich. Aufgezeichnet wurden die Aufnahmen auf einem verbundenen Computer mithilfe der benutzerdefinierten Software DSOasio3 V3.00 (Samplingrate: 22.050 Hz, Samplingtiefe: 32 Bit). Die Audiodateien wurden als zumeist vierstündige wav-Dateien gespeichert.



Abbildung 7. Technik-Setup vor der Voliere: Receiver, Audio/MIDI Interface und Oszilloskop sowie Bildschirm zur Aufzeichnung der Tonspuren

VI.5 Durchführung

Der Versuch erstreckte sich pro Versuchsreihe über einen Zeitraum von 71 aufeinanderfolgenden Stunden, von 10:00 Uhr an Versuchstag eins bis 09:00 Uhr an Versuchstag vier. Für den Versuch wurden die Legehennen in Gruppen à vier Tieren nacheinander in demselben ausgestalteten Raum mit einer Größe von 11,21 m² gehalten. Ihre Bewegungen und Lautäußerungen wurden mit speziellen Audiotransmittern auf dem Rücken sowie einer 360° - Überwachungskamera (*siehe VI.4. Versuchsaufbau*) kontinuierlich aufgezeichnet. Eine Versuchsreihe umfasste jeweils die Beprobung von zwei der vier Legehennen. Bei diesen wurde alle vier Stunden eine Menge von 0,5 bis 0,8 ml Blut über einen Venenverweilkatheter entnommen zur Erstellung eines Hormonverlaufprofils. Der gesamte Versuch beinhaltete sechs Versuchsreihen mit insgesamt 12 Legehennen im Alter zwischen 26 und 30 Wochen.

Nach dem Anlegen der Mikrofone und der Hühnerwarnwesten als Pickschutz wurde den zwei zu beprobenden Versuchstieren um 09:30 Uhr des ersten Versuchstags als präemptive Analgesie Meloxicam (Metacam® 5 mg/ml Injektionslösung für Hunde und Katzen, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Deutschland) in einer Dosierung von 0,5 mg/kg i.m. verabreicht. Um 10:00 Uhr wurden sie im Operationsraum der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische mit einer Isofluran-Inhalationsnarkose (5 Vol. % Isofluran zur Einleitung, 2-3 Vol. % Isofluran zur Erhaltung) wahrnehmungslos gemacht für das Anbringen eines Venenverweilkatheters zur Blutentnahme während der Versuchsphase. Bei dem Venenverweilkatheter handelte es sich um eine Vasofix Braunüle 22 G (25 mm, blau, B. Braun SE, Melsungen, Deutschland). Nach erfolgreichem Legen des Zugangs in der Vena ulnaris wurde der Katheter mit einem Mandrin (Mandrin für Vasofix®, G 22 x 25 mm, blau, B. Braun SE, Melsungen, Deutschland) verschlossen sowie mit zwei Einzelheften (Faden: Ethicon® VICRYL™ Plus violett, geflochten - Nadeltyp RB1-plus USP 4-0, Länge 0,70 m (VCP304H), © Johnson & Johnson Medical N.V., Brüssel, Belgien), einem transparenten Folienverband (Suprasorb F Folien Wundverband 5x7 cm steril, Lohmann & Rauscher GmbH & Co.KG, Neuwied, Deutschland) und einer selbsthaftenden, elastischen Bandage (PetFlex®-Binde 2,5 cm x 4,5 m, Covetrus DE GmbH, Düsseldorf, Deutschland) am Flügel adaptiert. Die Narkose dauerte durchschnittlich 10 min mit einer individuell unterschiedlichen Aufwachphase zwischen 5 und 24 min.

Nach der Narkose wurden die Versuchstiere für ca. eine halbe Stunde beobachtet, bevor sie in die Herde zurückgesetzt wurden.

Die für den Versuch definierten Blutentnahmezeitpunkte waren 12:00 Uhr, 16:00 Uhr, 20:00 Uhr, 00:00 Uhr, 04:00 Uhr und 08:00 Uhr für die folgenden 71 Stunden. Bei jedem Huhn wurde 18 Mal zwischen 0,5 und maximal 0,8 ml Blut entnommen, die insgesamt entnommene Blutmenge lag unter der vertretbaren Menge von 1 % des Körpergewichts innerhalb von 14 Tagen. Vor der Blutentnahme wurde der Venenkatheter jeweils mit 0,5 ml steriler, 0,9 % iger Kochsalzlösung (isotone Kochsalzlösung 0,9 %, Braun Ecoflac Plus, B. Braun SE, Melsungen, Deutschland) gespült. Nach der Blutentnahme wurden 0,5 ml einer 3 % igen Natriumzitat-Pufferlösung als Gerinnungshemmer und Blocklösung im Venenkatheter verwendet. Die Natriumzitat-Pufferlösung war zuvor durch Autoklavieren sterilisiert worden. Die Blutproben wurden mit einer 1 ml Feindosierungsspritze (Injekt®-F Solo, Einmal-Feindosierungsspritze, B. Braun SE, Melsungen, Deutschland) entnommen und vorübergehend in einem Probengefäß mit Lithium-Heparin-Beschichtung (Mikro-Probengefäß 1,3 ml, PE-Softstopfen, Lithium-Heparin, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) gelagert. Direkt nach der abgeschlossenen Blutentnahme bei den zwei Versuchstieren wurden die Blutproben bei 9000 Umdrehungen/min für 3 min zentrifugiert (Hettich Mikroliter-Zentrifuge MIKRO 120, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland). Das Blutplasma einer Probe wurde mithilfe einer Einkanalpipette (PHOENIX Instrument Einkanalpipette LHP1-V10, 10-100 µl, Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland) jeweils auf zwei Reaktionsgefäße (Reaktionsgefäße 0,25 ml, farblos, Polyethylen, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) für CORT (mind. 100 µl) und eine Reserve (mind. 200 µl) aufgeteilt und bei - 20 °C bis zur Bearbeitung gelagert.

VI.6 Laboranalytische Methoden

Die Plasmaproben für die Bestimmung der CORT-Konzentrationen wurden maximal sechs Wochen bei - 20 °C zwischengelagert und für Transportzwecke in Styroporkisten mit Trockeneis verstaubt. Die Messung der Konzentrationen erfolgte am Max-Planck-Institut für Biologische Intelligenz, in Gründung, mittels eines dort etablierten RIAs (Goymann et al. 2006). Im Folgenden wird das Protokoll des von Goymann et al. (2006) modifizierten RIAs im Detail beschrieben.

VI.6.1 Vorbereitung der Plasmaproben

Vor Entnahme des Plasmas wurden die Reaktionsgefäße mithilfe eines Kreisschüttlers (VWR® VV3, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) geschüttelt, um Plasmareste vom Deckel zu lösen. Für das CORT-Assay wurden je 20 µl mit einer Hamilton Spritze (25 µL Microliter Syringe HAMILTON Model 702 N, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) entnommen und in ein Reagenzglas gegeben. Anschließend wurde die Hamilton Spritze mit derselben Menge bidestilliertem Wasser (ddH₂O) gespült und der Spülrest wurde dem Reagenzglas hinzugefügt. Mit Plasma-Pool-Proben bekannter Hormonkonzentration wurden Kontrollproben für das Assay vorbereitet. Danach wurden die Reagenzgläser mit ddH₂O auf 300 oder 400 µl aufgefüllt mithilfe einer manuellen Handdispenser-Pipette (Eppendorf Multipette Plus, manueller Handdispenser Pipette 1 µl - 50ml, Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland). Zu jeder Assay-Probe (exklusive blank-Proben) wurden mit der Multipette Plus 10 µl radioaktiv markierte Steroidhormonlösung (Label von PerkinElmer®, Corticosterone, [1,2,6,7-3H(N)], PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika) mit einer bekannten Anzahl von Zerfällen pro Minute gegeben (1500 dpm (disintegrations per minute)). Zusätzlich wurden drei Szintillationsröhrchen (Beckman Coulter 592928 Mini Poly-Q Vials 6 ml, Beckman Coulter Inc., Brea, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika) mit je 10 µl radioaktiv markierter Steroidhormonlösung (PerkinElmer®, Corticosterone, [1,2,6,7-3H(N)]) und 4 ml Szintillationslösung (PerkinElmer® Ultima Gold) vorbereitet für die Messung der totalen Zerfälle pro Minute (dpm), womit der Prozentsatz der Wiedergewinnung ermittelt werden konnte. Die Reagenzgläser mit den Proben wurden daraufhin bei niedriger Geschwindigkeit mit einem

Kreisschüttler (IKA VXR basic Vibrax[®], IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland) für mindestens vier Stunden bei einer Temperatur von 4 °C geschüttelt. Danach wurden zu jeder Probe (inklusive blank- und Kontrollproben) 4 ml destilliertes Dichlormethan gegeben und die Reagenzgläser für mindestens zwei Stunden in den Kühlschrank bei 4 °C gestellt.

VI.6.2 Extraktion der Plasmaproben

Die Extraktion der Plasmaproben fand in zwei Durchgängen statt. Für die erste Extraktion wurden die Proben aus dem Kühlschrank geholt und kurz zentrifugiert (4000 Umdrehungen/min, 10 min, 4 °C) (Hettich Standkühlzentrifuge ROTIXA 50 RS). Anschließend wurde die wässrige Phase durch Drehung der Reagenzgläser in einem Kältebad aus Trockeneis und Spiritus an der Glaswand eingefroren. Dadurch konnte die organische Phase in andere Reagenzgläser überführt werden. Dieser Vorgang des Dekantierens wird daher auch als „freeze decant“ bezeichnet. Die so gewonnenen Proben wurden in einem Wasserbad von 40 °C mit einem Stickstoffverdampfer (institutseigene Konstruktion des Max-Planck-Instituts für Biologische Intelligenz, in Gründung) verdampft bis nur noch etwa 1 ml Dichlormethan übrig war. Für die zweite Extraktion wurden nochmals 2 ml Dichlormethan in die bereits extrahierten Reagenzgläser mit der wässrigen Phase gegeben und das Dekantieren wurde nach dem bereits beschriebenen Prozedere wiederholt. Die neu gewonnenen Proben wurden in die Probengefäße der ersten Extraktion hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben im Wasserbad (40 °C) mit dem Stickstoffverdampfer vollständig verdampft. Sobald die Proben völlig getrocknet waren wurden 300 µl Assay-Pufferlösung (Phosphat-Puffer, 0,1 M, pH 7,0: bidestilliertes Wasser, Gelatine, Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat, Natriumchlorid, Natriumazid) hinzugefügt und mithilfe des Kreisschüttlers in diesem gelöst. Dann wurden sie zentrifugiert (1000 Umdrehungen/min, 2 min) und abgedeckt sowie gekühlt für mindestens 1 Stunde.

VI.6.3 Ermittlung der Wiedergewinnungswerte

Für die Messung der prozentualen Wiedergewinnung im Assay wurden alle Proben (inklusive blank- und Kontrollproben) mit dem Kreisschüttler (VWR® VV3) geschüttelt und je 80 µl mit einer Einkanalpipette (Eppendorf Research® 10 - 100 µl) entnommen und in Szintillationsröhrchen gefüllt. In jedes Szintillationsröhrchen kamen zudem 4 ml Szintillationsflüssigkeit. Nach dem Verschrauben wurden die Proben gut geschüttelt und in den Flüssigszintillationszähler (Beckman Coulter LS6500 Multi-Purpose Scintillation Counter) gestellt, zusammen mit den zu Beginn vorbereiteten drei

Szintillationsröhrchen der totalen Wiedergewinnungsproben. Nach vier Stunden Wartezeit wurden die Proben für je 10 min gemessen.

VI.6.4 Radioimmunoassay

Vorbereitend musste eine Holzkohlelösung (Phosphat-Pufferlösung, Dextranlösung aus bidestilliertem Wasser und Dextran, Holzkohle) in der Kältekammer bei 4 °C hergestellt und für mindestens zwei Stunden gerührt werden.

Alle Proben wurden im Assay doppelt gemessen und die Messwerte gemittelt. Neben den Blutplasmaproben wurden auch blank-Proben sowie niedrige und hohe Kontrollproben gemessen. Die Aufteilung der extrahierten Plasmaproben für das Assay erfolgte mit einer Einkanalpipette (Eppendorf Research® 20 - 200 µl).

Für jedes CORT-Assay wurden Standardkurven ermittelt. Die Standardkurve dient der Ermittlung der Steroiddosis in den unbekanntenen Proben. Dazu wurden zwei Verdünnungsreihen angelegt. Jeweils drei Reagenzgläser enthielten die Proben für die Messung der Gesamtzahl (total counts), der nicht-spezifischen Bindung (non-specific binding) und der maximalen Bindung mit dem Antiserum (CORT: Esoterix B3-163, Laboratory Corporation of America® Holdings (Labcorp), Burlington, North Carolina, Vereinigte Staaten von Amerika) im Assay. Zusätzlich wurden je 10 Reagenzgläser pro Verdünnungsreihe vorbereitet mit je 100 µl Phosphat-Pufferlösung. In das erste Glas einer Reihe wurden zudem 100 µl Standard-Steroidlösung (CORT: C2505, 2000 pg/100 µl, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika) gegeben. Nach guter Durchmischung mit dem Kreisschüttler wurden 100 µl aus Glas eins mit einer Hamilton-Spritze (100 µL Microliter Syringe HAMILTON Model 710 N) entnommen und in Glas zwei gegeben. Dieses Prozedere wurde bis Glas 10 fortgeführt und die 100 µl aus Glas 10 entnommen und verworfen.

VI.6.5 Trennung gebundener und freier Zählwerte (Spin-down)

In der Kältekammer wurde zu jedem Reagenzglas (exklusive der total counts) Holzkohlelösung hinzugefügt, um ungebundenes Steroidhormon zu absorbieren. In die drei Reagenzgläser der total counts wurden 500 µl Phosphat-Pufferlösung gefüllt und innerhalb von 14 min so schnell wie möglich 500 µl Holzkohlelösung in alle anderen Reagenzgläser verteilt. Im Anschluss wurden die Gläser vorsichtig manuell geschüttelt und in den Kühlschrank gestellt. Kurz vor Ablauf der 14 min

wurden sie herausgeholt und für 10 min bei 4 °C und 4000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Im Kälteraum wurde der Überstand (flüssige Phase) in Szintillationsröhrchen dekantiert, die Holzkohle mit dem gebundenen Steroidhormon verblieb am Boden des Reagenzglases. In jedes Szintillationsröhrchen wurden anschließend 4 ml Szintillationslösung gegeben und nach Verschließen der Gefäße wurden sie kräftig geschüttelt. Zum Schluss wurden alle Gefäße in die Gestelle des Flüssigszintillationszählers gestellt und nach vier Stunden Wartezeit für 10 min gezählt.

VII. Ergebnisse:

VII.1 Ergebnisse Hormonmessung

Alle sechs Versuchsreihen konnten, wie im Voraus geplant, durchgeführt werden. Im Zeitraum zwischen dem 21.07. und dem 06.10.2021 wurden alle 12 Legehennen nach dem oben beschriebenen Protokoll beprobt. Die Zeit zwischen Einfangen der Legehennen und abgeschlossener Blutentnahme betrug durchschnittlich 2,5 Minuten, mit einem Minimum von einer Minute und einem Maximum von sieben Minuten (*Publikation, Supplementary Material, Table S2*). Die gewonnenen 216 Plasmaproben wurden für die CORT-RIAs zwischen dem 30.08. und dem 05.11.2021 nach dem zuvor beschriebenen Protokoll verwendet. Alle Proben waren auswertbar und lieferten Messwerte (*Tabelle 1*). Die RIAs wurden in drei Gruppen durchgeführt mit einer Nachweisgrenze von 3,15 – 3,63 pg/ml. Die Messgenauigkeit der drei RIA-Gruppen war gut mit einem Intra-Assay-Variationskoeffizienten (CV) von 5,5 – 7,9 %, einem Inter-Assay-CV von 7,8 %, einem Intra-Extraktions-CV von 4,7 – 7,1 % und einem Inter-Extraktions-CV von 6,7 %.

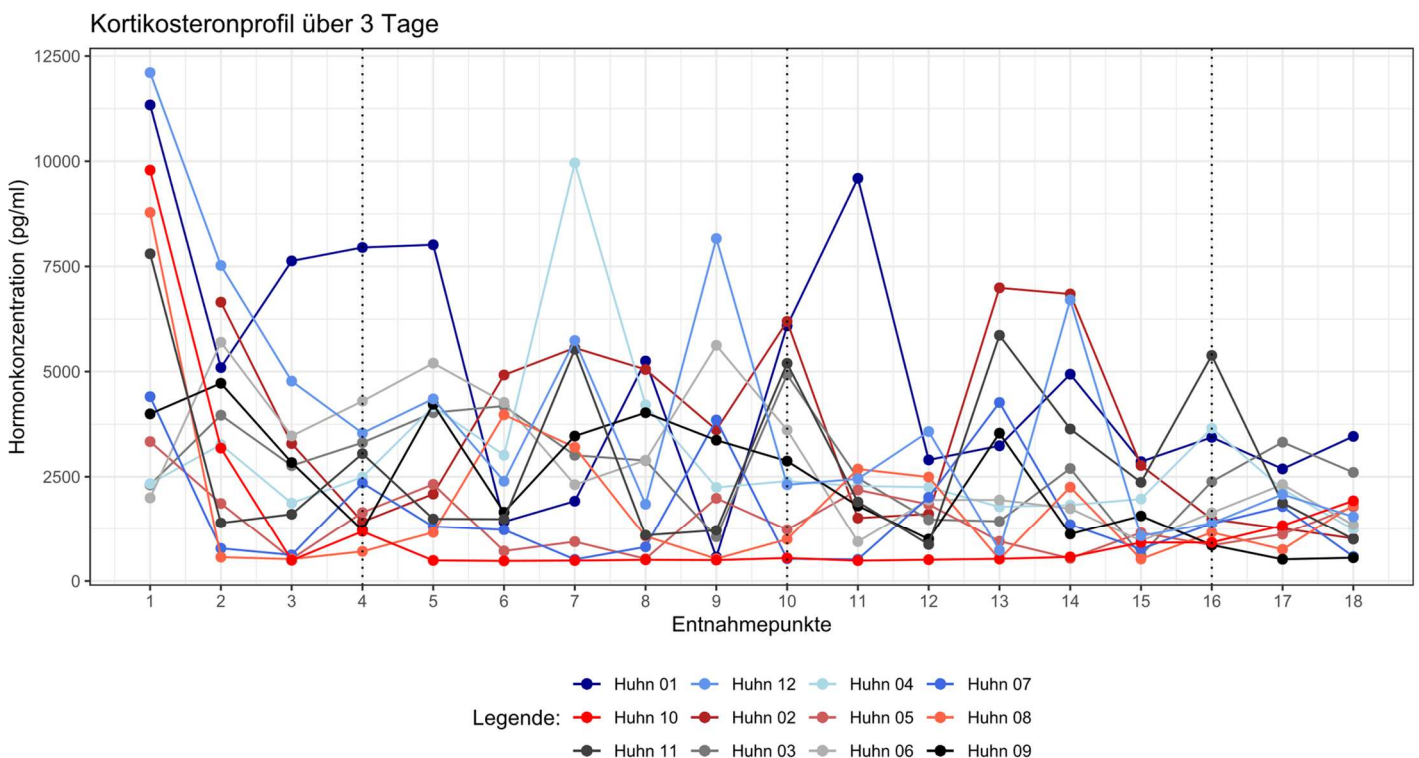


Abbildung 8. Verlaufsprofil CORT-Konzentrationen (pg/ml) aller Legehennen über 3 Tage, Blutprobennahme alle 4 Stunden (1, 7, 13 = 12:00; 2, 8, 14 = 16:00; 3, 9, 15 = 20:00; 4, 10, 16 = 00:00; 5, 11, 17 = 04:00; 6, 12, 18 = 08:00), exklusive Ausreißer von Henne Nr. 2 (37.068 pg/ml) (n = 215)

Für die Auswertung der CORT-Werte wurden die ersten Messwerte aller Hennen ausgeschlossen ($n = 204$), da diese aufgrund der Isofluran-Narkose und des Transportstresses kurz vor der ersten Blutentnahme potenziell erhöht sein könnten (Jacobsen et al. 2012; Bekhbat et al. 2016). Nach Ausschluss der ersten Messdaten lagen die minimalen CORT-Werte aller Hennen zwischen 479,3 pg/ml und 1237,3 pg/ml, während die Höchstwerte 2319,4 pg/ml bis 9958,9 pg/ml betragen. Die durchschnittliche CORT-Konzentration der Hennen lag zwischen $885,7 \pm 716,4$ pg/ml und $4532,7 \pm 2592,4$ pg/ml (*Publikation, Supplementary Material, Table S3*). Die einzelnen Legehennen unterschieden sich deutlich in ihren individuellen CORT-Werten (*Publikation, Supplementary Material, Figure S3*). Bei der Analyse der CORT-Konzentrationen im Zeitverlauf war der erste Messwert bei acht von zwölf Hennen deutlich höher als die folgenden, wobei Henne Nr. 2 den höchsten CORT-Wert aller Tiere aufwies (37.068 pg/ml) (*Abbildung 8, exklusive Ausreißer von Henne Nr. 2*). Sieben Hennen (Hennen Nr. 1, 2, 6, 8, 10, 11, 12) hatten bei dem ersten oder zweiten Blutentnahmezeitpunkt CORT-Werte über 5000 pg/ml. Im folgenden Verlauf waren Werte > 5000 pg/ml nur bei einzelnen Probennahmen bei sechs Tieren (Hennen Nr. 1, 2, 4, 6, 11, 12) reproduzierbar (14,35 % aller Messwerte > 5000 pg/ml). Zehn Hennen (alle außer Hennen Nr. 2 und 10) zeigten CORT-Profile mit multiplen, deutlichen Peaks im Verlauf von drei Tagen. Henne Nr. 2 zeigte in den drei Tagen kaum CORT-Erhöhungen, oft nur einen Peak am Tag. Henne Nr. 10 wies von allen Hennen die niedrigsten CORT-Werte ohne deutliche Peaks auf. Die höchsten CORT-Werte waren bei den meisten Tiere mittags (zwischen 12:00 Uhr und 16:00 Uhr) und nachts (zwischen 00:00 Uhr und 04:00 Uhr) zu finden.

Tabelle 1. Plasma-CORT-Konzentrationen (pg/ml) aller Legehennen

CORT (pg/ml)												
Huhn	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
1 12:00	11337,88	37068,27	2307,67	2335,83	3336,32	1995,83	4404,87	8782,14	3994,85	9788,77	7800,25	12106,48
2 16:00	5095,93	6651,09	3963,98	3264,00	1861,96	5698,87	779,25	568,70	4722,59	3181,24	1393,52	7522,46
3 20:00	7630,30	3290,02	2764,11	1870,20	526,28	3469,83	622,02	522,23	2837,19	493,97	1603,92	4774,27
4 00:00	7950,79	1422,17	3311,44	2493,69	1646,19	4297,83	2350,36	706,56	1219,75	1184,26	3049,51	3538,03
5 04:00	8014,69	2087,32	4024,38	4165,21	2319,44	5200,75	1305,51	1161,32	4224,67	490,12	1491,80	4351,45
6 08:00	1422,68	4919,63	4181,82	3014,24	716,10	4268,71	1224,65	3975,19	1654,56	479,26	1485,59	2394,46
7 12:00	1917,62	5563,41	3011,64	9958,90	939,27	2311,54	514,94	3200,94	3468,19	486,78	5529,48	5739,68
8 16:00	5251,65	5050,30	2886,05	4208,96	529,37	2892,52	813,75	1069,49	4023,79	504,59	1094,46	1844,51
9 20:00	571,23	3616,93	1057,69	2246,24	1986,00	5623,81	3849,95	531,61	3370,76	498,45	1213,69	8163,50
10 00:00	6087,10	6193,54	4925,26	2394,54	1232,09	3611,79	530,07	998,15	2872,99	547,99	5195,56	2310,52
11 04:00	9593,64	1512,50	2466,94	2278,06	2186,01	940,52	515,66	2683,63	1804,58	485,27	1897,98	2449,77
12 08:00	2901,22	1610,55	1474,27	2254,15	1840,60	1947,31	2009,66	2492,91	1001,00	507,69	872,75	3574,64
13 12:00	3236,69	6990,52	1434,59	1780,71	948,77	1947,37	4265,40	519,34	3536,34	529,36	5862,60	732,78
14 16:00	4937,92	6844,06	2696,47	1822,47	539,29	1740,00	1353,55	2251,54	1123,18	573,67	3636,83	6705,21
15 20:00	2858,89	2769,02	620,16	1969,05	1155,55	957,40	761,56	523,96	1562,09	918,35	2367,78	1077,83
16 00:00	3437,97	1485,78	2385,01	3653,27	852,16	1638,99	1374,29	1159,98	858,71	920,72	5384,59	1386,98
17 04:00	2686,96	1257,69	3322,05	2204,42	1117,57	2314,46	1787,44	753,24	517,85	1329,65	1876,19	2078,60
18 08:00	3460,48	1015,70	2604,49	1237,26	1785,03	1345,90	582,68	1826,50	554,61	1926,23	998,68	1544,89

VII.2 Auswertung des Audio- und Videomaterials

Die Audio- und Videoaufnahmen wurden nach der Versuchsdurchführung von der externen HDD-Festplatte zur langfristigen Speicherung auf einen Server der Tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München hochgeladen.

Die Audiodateispeicherung erfolgte im wav-Format. Insgesamt wurden für jedes Tier 71 Stunden Mikrofonaufnahmen angefertigt sowie je eine Signalgeber-Spur (zeitliche Synchronisation mit Videospur) und ab der dritten Versuchsreihe (12.08. - 15.08.2021) eine Tonspur eines zusätzlich im Versuchsraum aufgehängten Mikrofons aufgezeichnet. Somit liegen insgesamt etwa 426 Stunden Audiomaterial vor.

Während der ersten Versuchsreihe (21.07. - 24.07.2021) war von 09:59 Uhr bis 15:00 Uhr die Signalgeber-Spur nicht eingeschaltet, weshalb in dieser Zeit die Audioaufnahmen während der Auswertung nicht mit dem Video synchronisiert werden konnten.

Während der zweiten Versuchsreihe (28.07. - 31.07.2021) wurde von 09:57 Uhr am 28.07. bis 12:52 Uhr am 30.07. von den beiden Audiotransmittern der Hühner Nr. 1 und Nr. 4 dieselbe Frequenz aufgezeichnet. Anhand der Spektrogramm-Analyse war erkennbar, dass beide Receiver das Huhn Nr. 1 aufgenommen hatten. Zudem wurde zwischen 10:02 Uhr und 12:48 Uhr am 30.07. bei Huhn Nr. 1 der Audiotransmitter überprüft wegen eines fehlenden Signals. Da ein Batteriewechsel keinen Erfolg brachte, wurde der Audiotransmitter komplett ausgetauscht und die Receiver-Frequenz manuell neu eingestellt. Im Anschluss funktionierte die Aufnahme wieder ohne Einschränkungen.

Die Audioaufnahmen wurden mit der Open-Source-Software Audacity® (Version Audacity, 2.4.2 für Windows) visuell und auditiv dargestellt und ausgewertet. Mit Darstellung der wav-Dateien als Spektrogramm konnten die von den Hühnern erzeugten Vokalisationen als Frequenzmuster mit ihrer Amplitude dargestellt sowie angehört werden. Die Aufnahmen mit der Software DSOAsio3 wurden mit 22.050 Hz aufgenommen und in Audacity mit einer Standard-Samplefrequenz von 22.050 Hz und 32-Bit-Float wiedergegeben. Die y-Achse zeigt den Frequenzbereich, der in der Standardeinstellung von 0 bis 8000 Hz gewählt wurde, die x-Achse stellt den zeitlichen Verlauf dar.

Der Schalldruckpegel (dB) wird mithilfe von 5 Farben in dem Spektrogramm von Audacity wiedergespiegelt. Die Verstärkung beträgt standardmäßig 20 dB und der dargestellte Bereich umfasst

80 dB. Die in weiß dargestellte Frequenz entspricht somit einem Signal von - 20 dB. Der dargestellte Bereich von 80 dB wird mit einer farblichen Abstufung von je 20 dB angezeigt (Audacity 2023).

Die zeitgleich aufgenommenen Audiospuren der vier Hühner, die Signalgeber-Spur und ab der dritten Versuchsreihe auch die zusätzliche Mikrofonspur wurden untereinander in Audacity geöffnet. Ihre Aufnahmezeit wurde durch das Audio/MIDI Interface (M-Audio Fast Track Ultra 8R) bereits synchronisiert, daher konnten dieselben Zeitpunkte untereinander dargestellt und direkt verglichen werden. Die Frequenz eines vokalisierenden Huhns war am höchsten bei Vergleich aller Tonspuren zu einem Zeitpunkt, dadurch konnten die aufgezeichneten Lautäußerungen den einzelnen Tieren zugeordnet werden. In den via Spektrogramm dargestellten Aufnahmen wurde visuell nach Auffälligkeiten gesucht. Hierzu zählten sowohl längere „wellenförmige“ sowie kurze, vertikale „punkt-/strichförmige“ Muster. Kurze, hohe Laute (0,33 sek.) oder langgezogene Schreie (1 sek.) wurden als potenziell Distress-assoziiert gewertet und notiert, um in den Videos das damit verbundene Verhalten der Hühner zu bewerten. Sowohl die Tage als auch die Nächte wurden auditiv ausgewertet.

Für jede Versuchsreihe wurden 71 Stunden Videomaterial aufgenommen, die Überwachungskamera lief 24 Stunden am Tag. Insgesamt fielen somit etwa 426 Stunden Filmmaterial im avi-Format zur Auswertung an. Zur Auswertung wurde das GeoVision Multicam Surveillance System (Version 8.5.7.0) mit der Funktion ViewLog genutzt. Damit konnten die Videos in unterschiedlichen Geschwindigkeiten wiedergegeben, Bildausschnitte vergrößert sowie der Kamera-Blickwinkel verändert werden. Der vorrangig genutzte Ansichtsmodus war „Mega Pixel View (PIP)“, welcher den Stallraum in einer 360° - Ansicht zeigte und mit welchem einzelne Videoausschnitte durch Scrollen schnell vergrößert werden konnten. Es wurden alle Tage und Nächte visuell und auditiv ausgewertet, da bereits bei den ersten Videos vokalisationsloses Dominanzverhalten auffiel. Vorrangig wurden in den Videos die Zeitpunkte der auffälligen Vokalisationen betrachtet sowie 15 Minuten vor und nach der Blutentnahme. Dies geschah in der Originalgeschwindigkeit, die restlichen Aufnahmeintervalle wurden mit einem Schieberegler in ViewLog durchgescrollt. Sobald sich zwei Hühner auf eine Distanz von unter 0,5 m annäherten wurde das Video mit normaler Geschwindigkeit wiedergegeben. Auffälligkeiten im Verhalten sowie die Eiablage wurden tabellarisch festgehalten.

Bei der ersten Versuchsdurchführung wurde am 23.07.2021 von 10:39 Uhr bis 12:23 Uhr kein Video aufgezeichnet. Der Grund hierfür war, dass der Speicherort für die avi-Dateien während der Versuchsreihe geändert werden musste wegen mangelndem Speicherplatz. Es wurde dabei nicht bemerkt, dass die Überwachungskamera durch den Wechsel ausgeschaltet wurde, denn es war weiterhin ein Live-Bild verfügbar, welches sich kaum von dem Aufnahmemodus unterschied.

Während der experimentellen Phase wurde keine Aggression im Zusammenhang mit Verletzungen durch Picken unter den Herdenmitgliedern beobachtet. Dominantes Verhalten trat in allen Gruppen auf. Anzeichen von Dominanz waren beispielsweise das Bepicken von Kopf/Kamm/Federn während des Tages, ohne dass dies zu Verletzungen führte, das Verjagen der anderen Hennen vom Futter/Wasser oder aus der individuellen Komfortzone und das Bepicken während des Aufbaumens auf den Sitzstangen. Während der sechs Versuchsreihen traten keine Verletzungen auf.

Die Anzahl des erkennbaren Dominanzverhaltens variierte stark zwischen den Individuen der Gruppen. Drohgebärden oder Attacken wurden häufig nicht von Vokalisationen begleitet. Nur in wenigen Fällen schrien Hennen als Reaktion darauf, dass sie bepickt wurden oder dass man sie zur Blutentnahme aufhob, vor allem in der Nacht. Diese Ereignisse wurden als Distress bewertet (*Publikation, Supplementary Material, Table S2*).

So wurde z. B. Henne Nr. 2 der Gruppe eins während der ersten Versuchsreihe zwischen ein und 26 Mal pro Tag bepickt und bis zu 28 Mal gejagt. In der zweiten Versuchsreihe verringerte sich die Häufigkeit des Bepickens auf null bis 12 Mal pro Tag, aber das Verjagen blieb mit ein bis 20 Vorfällen hoch. Henne Nr. 1 in dieser Gruppe wurde nie bepickt oder gejagt, Henne Nr. 3 wurde während des gesamten Versuchs nur zweimal bepickt und Henne Nr. 4 wurde ein- bis viermal pro Tag gepickt und einmal während des Versuchs gejagt. In der zweiten Gruppe war Henne Nr. 5 den meisten Dominanzgesten ausgesetzt, wobei sie bis zu siebenmal pro Tag gepickt und maximal zweimal verjagt wurde. Die Hennen Nr. 6 und 8 wurden in beiden Versuchsreihen der Gruppe zwei nur zweimal bepickt, Henne Nr. 7 wurde während der Versuchsphase dreimal gepickt und einmal gejagt. In den Gruppen eins und zwei nahm das dominante Verhalten mit der Zeit ab. Die Tiere der dritten Gruppe zeigten das geringste Dominanzverhalten: Henne Nr. 9 wurde während des Versuchs dreimal bepickt, die Hennen

Nr. 11 und 12 wurden jeweils einmal gepickt, und bei Henne Nr. 10 wurde kein erlebtes Dominanzverhalten festgestellt.

Alle Hennen exklusive Henne Nr. 10 (Gruppe drei) legten jeweils ein Ei pro Tag (bei Henne zehn wurde sowohl vor als auch während der Versuche keine Eiablage beobachtet). Diese Henne begann etwa zwei Wochen nach dem Ende der Versuchsphase mit dem Legen von Eiern. Diese Eier hatten eine hellere Schalenfarbe als die Eier der anderen Hennen und waren deutlich kleiner. Die anderen Hennen der Gruppe drei waren bereits vor dem Versuch bei der Eiablage beobachtet worden und in den Legenestern wurden auch während der Versuchsreihen je drei Eier pro Tag gefunden. Allerdings war die Eiablage in den Videoaufzeichnungen nicht immer eindeutig zu erkennen und konnte den einzelnen Hennen nicht zugeordnet werden, da die meisten von ihnen eine sehr ähnliche Gefiederfarbe hatten und alle die gleichen Warnwesten trugen. Etwa die Hälfte der Eiablagen wurde aufgrund von Verhaltensweisen wie längerem Verbleiben im Legenest oder anhand von Audioaufnahmen abgeschätzt. Dies geschah unter Berücksichtigung eines Geräusches eines auf Boden fallenden Eis (im Legenest, auf der Belüftungsanlage etc.) in Verbindung mit einer anschließenden visuellen Überprüfung der Legeplätze in den auffälligen, vierstündigen Zeitfenstern, inklusive Einsammeln der Eier. Die Eiablagezeiten lagen zwischen 06:14 Uhr und 16:56 Uhr.

VII.3 Statistische Auswertung

Die Erstberechnung der Statistik ($n = 216$) wurde durch den Statistiker Herrn Yury Zablotki durchgeführt, welcher im Folgenden auch für einzelne Fragestellungen erneut konsultiert wurde. Die Neuberechnungen exklusive der ersten CORT-Messungen ($n = 204$) sowie die Programmierung der im Publikationsmanuskript sowie dem Dissertationsmanuskript verwendeten grafischen Darstellungen wurde im Anschluss eigenständig durchgeführt.

Die beschreibende Statistik wurde auf die einzelnen Tiere und Blutentnahmezeiten mit R Studio (R Version 4.1.3 (2022-03-10), RStudio Team (2022): Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>) angewendet. Mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests und Quantil-Quantil-Plots wurden die Daten auf das Vorliegen einer Normalverteilung überprüft, welche hier nicht gegeben war (*Publikation, Supplementary Material, Table S6 und Figure S2*). Mit dem Kruskal-Wallis-Test wurden Unterschiede zwischen den CORT-Werten der Hennen dargestellt (*Publikation, Supplementary Material, Figure S3*).

Bei mehreren Tieren traten Ausreißer der CORT-Werte auf. Daher wurde die robuste Variante des linearen Mixed-Effects-Modells verwendet, um den Zusammenhang zwischen den Probennahmezeitpunkten als festem Faktor, den CORT-Werten als abhängigen Variablen und den 12 Hennen als Zufallsfaktor zu beschreiben.

Auf einen Korrekturfaktor wurde verzichtet, um in dieser Pilotstudie keine Effekte zu übersehen. Geschätzte Randmittel mit einem Konfidenzintervall von 0,95 wurden als Post-Hoc-Test angewendet, um Unterschiede zwischen mittleren Hormonkonzentrationen zu den verschiedenen Zeitpunkten zu beschreiben.

Für die Bewertung der Post-hoc-Testergebnisse wurden herkömmliche Schwellenwerte für die p-Wert-Interpretation herangezogen, wie von Raiola und Di Tore beschrieben (2012).

Die Studie zur Ermittlung eines zirkadianen CORT-Profiles beim weiblichen Haushuhn wurde als Pilotstudie geplant, um im Sinne des 3R-Prinzips (Replacement, Reduction, Refinement) die benötigte Tierzahl so gering wie möglich zu halten (Zimmerman et al. 2000; Evans und Evans 2007). Statistikbezogene Literatur schlägt ein Minimum von 12 Individuen pro Gruppe vor. Aber da eine wiederholte Probennahme über drei Tage bei jedem der Tiere geplant war, wurde

die Entscheidung getroffen, die Gesamtzahl der Tiere zu reduzieren (Kokolakis et al. 2010; Tefera 2012).

Die grafischen Darstellungen der gemessenen CORT-Konzentrationen aller Legehennen wurden durch ein robustes lineares Mixed-Effects-Modell bestätigt, welches einen signifikanten CORT-Peak mittags zwischen 12:00 Uhr und 16:00 Uhr ($p < 0,05$) und einen zweiten, statistisch nicht signifikanten Peak um 00:00 Uhr ($0,12 < p < 0,53$) zeigte (*Publikation, Figure 1*). Diese Ergebnisse wurden durch geschätzte Randmittelwerte der CORT-Konzentrationen geprüft (*Publikation, Supplementary Material, Tables S8 und S9*).

Bei individueller Betrachtung der drei Gruppen zeigten die im Juli beprobten Hennen der Gruppe eins die höchsten mittleren CORT-Konzentrationen um 16:00 Uhr ($p < 0,05$) und einen niedrigeren zweiten, nicht signifikanten Peak um 00:00 Uhr ($0,07 < p < 0,87$) (*Publikation, Supplementary Material, Figure S4*). Das Effektmodell für die Hennen der Gruppe zwei (Hennen Nr. 5 bis 8) zeigte einen kontinuierlichen Anstieg von 20:00 Uhr bis 08:00 Uhr, gefolgt von einer Abnahme der CORT-Konzentrationen (*Publikation, Supplementary Material, Figure S5*), jedoch ohne signifikante Erhöhungen. Gruppe drei (Hennen Nr. 9 bis 12) wies um 12:00 Uhr einen signifikanten Höhepunkt auf ($p < 0,05$) sowie eine signifikante Differenz zwischen den CORT-Konzentrationen der Zeitpunkte 08:00 Uhr und 16:00 Uhr ($p < 0,05$). Nach dem Peak um 12:00 Uhr nahmen die CORT-Konzentrationen bis 08:00 Uhr ab (*Publikation, Supplementary Material, Figure S6*).

Der Abstand zwischen den einzelnen Peaks variierte zwischen den einzelnen Tieren, betrug jedoch meist etwa 12 Stunden (*Publikation, Supplementary Material, Table S2*). Jedoch traten auch Intervalle von 8 Stunden (z. B. Hennen Nr. 5 und 12), 16 Stunden (z. B. Henne Nr. 3) oder 20 Stunden (z. B. Henne Nr. 8) auf, was zu einer zeitlichen Verschiebung der Hormonpeaks an den darauffolgenden Tagen führte (*Abbildung 8*). Die Legehennen wiesen deutliche individuelle Unterschiede zwischen den Hormonwerten auf, bei denen die Differenz zwischen ihren Medianen bis zu 2931,1 pg/ml betrug (*Publikation, Supplementary Material, Table S5*).

Bezüglich der Eiablage konnten keine genauen Zeitpunkte für jede einzelne Henne ermittelt werden. Von der vermuteten und beobachteten Eiablage aller Hennen pro Tag (zwischen 06:14 Uhr und 16:56 Uhr) wurde die Zeitspanne bis zum nächsten CORT-Peak ermittelt und daraus abgeschätzt, dass die

CORT-Peaks zwei Stunden 55 Minuten bis 10 Stunden 12 Minuten vor der Eiablage auftraten (*Publikation, Supplementary Material, Table S2*).

Es gab keine Korrelation zwischen den CORT-Peaks und aggressivem Verhalten, da während der Experimente keine Aggression mit Verletzung der Tiere auftrat. Bei 15,6 % der Peaks war der CORT-Anstieg mit vorherigem Dominanzverhalten assoziiert, welches anhand der Videoanalyse ermittelt wurde (*Publikation, Supplementary Material, Table S2*). Bei weiteren 7,8 % der CORT-Peaks war ein Zusammenhang mit Dominanzverhalten nicht eindeutig, da dieses Verhalten entweder nicht eindeutig auf den Videos erkennbar war oder außerhalb des Rahmens von 30 Minuten vor der Blutentnahme auftrat. Die restlichen 76,6 % der CORT-Peaks waren nicht mit dominantem Verhalten assoziiert. Die Zeitspanne zwischen Einfangen und erfolgter Blutentnahme korrelierte nicht mit den CORT-Peaks (*Publikation, Supplementary Material, Tables S10 und S11*).

Bezogen auf alle Blutentnahmezeiten (n = 216) waren 82 % davon mit einer Beprobungsdauer von ≤ 3 min und 16 % mit > 3 min verbunden, bei 2 % der Probennahmen konnten aufgrund fehlender Videoaufzeichnungen keine Daten erhoben werden. Insgesamt zeigten nur 29,6 % der ermittelten CORT-Werte auffällige Erhöhungen (n = 64). Von diesen CORT-Peaks waren 65,6 % mit einer Beprobungszeit von ≤ 3 Minuten verbunden, davon 4,7 % innerhalb von 1 Minute, und 31,3 % mit einer Zeitspanne > 3 Minuten (*Publikation, Supplementary Material, Table S2*). Aufgrund fehlender Videoaufzeichnungen der Blutentnahme konnten 3,1 % der CORT-Peaks nicht der Dauer der Blutentnahme zugeordnet werden.

VIII. Diskussion

Der Stressbeurteilung kommt einerseits wegen der großen Zahl von Intensivtierhaltungen in der Lebensmittelproduktion, sowie andererseits wegen einem gesteigerten Interesse der Öffentlichkeit an dem Tierwohl große Bedeutung zu. Voraussetzung hierfür sind die Kenntnisse über physiologische Zustände im Körper, einschließlich des CORT-Metabolismus. Die Studie der Dissertation thematisierte die Machbarkeit einer kontinuierlichen Blutentnahme über drei Tage sowie die Erstellung eines zirkadianen Hormonprofils von CORT bei Legehennen (*Gallus gallus domesticus*) und dessen physiologische Bedeutung sowie die Anwendbarkeit für die Stressbeurteilung. Bei 12 Legehennen der Rasse Lohmann Brown im Alter von 26 bis 30 Wochen wurden im Abstand von vier Stunden über drei Tage 18 Blutproben über einen Venenverweilkatheter entnommen. Während der gesamten Versuchsdurchführungen wurden Audio- und Videoaufnahmen der Versuchstiere aufgezeichnet. Die Analyse der CORT-Konzentrationen erfolgte mittels RIA. Dies ist die erste Studie zur Ermittlung eines zirkadianen Hormonprofils bei in Gruppen lebenden Hennen, welche sich in einer ausgestalteten Voliere frei bewegen konnten und deren Verhalten kontinuierlich dokumentiert wurde. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass CORT bei Legehennen eine zirkadiane Rhythmik mit bis zu zwei CORT-Peaks am Tag aufweist, wobei deutliche individuelle Schwankungen auftreten können (Hillebrecht et al. 2024). Nichtsdestotrotz handelte es sich dabei zunächst um eine Pilotstudie mit einer geringen Tierzahl und die zirkadiane CORT-Rhythmik muss durch weiterführende Forschungsarbeiten auf Reproduzierbarkeit und gesteigerte statistische Belastbarkeit bei Verwendung einer höheren Tierzahl untersucht werden. Ein weiterer Ansatz zur Erforschung kausaler Zusammenhänge mit einem zirkadianen CORT-Rhythmus ist die ergänzende Messung korrelierender Hormone, die Bestimmung von Lichtintensität und -qualität bzw. der Dauer der Photophase oder die Aufzeichnung der Eiablage.

VIII.1 Studiendesign

Die zuvor beschriebenen Haltungsbedingungen wurden gewählt, um eine möglichst optimale Umgebung zur Ermittlung physiologischer Hormonkonzentrationen zu simulieren. Wildlebende Bankivahühner leben in kleinen Gruppen von bis zu 20 Tieren mit einer ausgeprägten Rang- und

Hackordnung zusammen (Javed und Rahmani 2000). Größere Gruppen, wie sie zumeist bei einer Intensivtierhaltung anzutreffen sind, aber auch ungeeignete Haltungsbedingungen können ein großes Maß an Distress bei den Individuen auslösen (Chen et al. 2019; Gomes et al. 2014; von Eugen et al. 2019; Derkho et al. 2021). Statistikbezogene Literatur schlägt ein Minimum von 12 Individuen pro Gruppe für eine Pilotstudie vor. Nach einer statistischen Berechnung durch den Statistiker Herrn Yury Zablotzki wäre für ein Vertrauensniveau von 95 % eine Tierzahl von etwa 60 Individuen notwendig gewesen. Da jedoch die Probennahme bei jedem der Versuchstiere über drei Tage wiederholt wurde, entschieden wir uns, die Gesamtanzahl für diese Pilotstudie unter Berücksichtigung des 3R-Prinzips zu reduzieren (Julious 2005; Ko und Lim 2021). Die im Anschluss an die experimentelle Phase durchgeführte statistische Auswertung konnte belegen, dass die zuvor gewählte Zahl von 12 Individuen bei einer wiederholten Probennahme ausreichend war, um signifikante Effekte einer zirkadianen Rhythmik von CORT nachweisen zu können.

Für die Beurteilung eines potenziellen Stresszustands von Tieren werden häufig Video- und Audioaufnahmen herangezogen (Mao et al. 2022; Lee et al. 2015; Branco et al. 2020; Neethirajan 2023; Lundén et al. 2022). Aus diesem Grund wählten wir eine Kombination von Video- und Audioüberwachung mit einer Blutprobennahme zur Erstellung des zirkadianen CORT-Profiles, zumal CORT-Werte aus dem Blutplasma sowohl physiologische (hohe) Basalwerte als auch akute, Distress-assoziierte Erhöhungen abbilden können (Beuving und Vonder 1978; Wingfield et al. 1982). Die Verwendung eines Venenverweilkatheters in der Vena ulnaris hatte sich hierbei in vorherigen Studien als günstig erwiesen, um wiederholt Blutproben entnehmen zu können unter Vermeidung von Schwankungen der CORT-Konzentrationen, welche durch eine Venen- oder Herzpunktion ausgelöst werden können (Johnson 1981). Während der experimentellen Phase konnten durch Verwendung eines peripheren Venenverweilkatheters in den meisten Fällen physiologische CORT-Konzentrationen ohne akuten Distress (76,6 %) ermittelt werden (Hillebrecht et al. 2024). Die Versuchstiere tolerierten den Venenkatheter unter einem Verband am Flügel gut, da sie bereits durch die vorangegangene Trainingsphase sowohl an das Tragen eines Verbands als auch an eine wiederholte Handhabung am Tag gewöhnt waren.

Zur in-vivo Gerinnungshemmung wurde als Spüllösung eine 3 % ige Natriumzitat-Pufferlösung eingesetzt, welche in Verbindung mit einem Obturator effektiv eine Koagulation im Venenkatheter verhinderte. Zwei Versuchstiere wiesen am letzten Versuchstag eine Phlebitis mit Verhärtung der Vena ulnaris auf, weshalb eine Reizung der Venen durch das Natriumzitat nicht ausgeschlossen werden kann. Jedoch sind als Ursache die Verweildauer des Venenkatheters, eine mechanische Reizung durch die Blutentnahmen sowie eine bakterielle Kontamination während der Probennahmen wahrscheinlicher, da nur bei zwei von 12 Legehennen eine Phlebitis auftrat (Cicolini et al. 2014). Natriumzitat weist jedoch den Nachteil auf, dass es bei Blut von *Aras (Ara sp.)* ab einer Expositionsdauer von mehr als 12 Stunden die Hämolyse zu fördern scheint (Harr et al. 2005). Für Hühnerblut liegen derzeit keine vergleichbaren Untersuchungen vor. Vor Entnahme der Blutproben wurde der Venenkatheter jeweils mit steriler, 0,9 % iger Kochsalzlösung gespült und die entnommenen Proben wurden umgehend zentrifugiert und bei - 20 °C eingefroren. Daher war kein Einfluss auf die Proben und somit auf die CORT-Messwerte zu erwarten. Das Allgemeinbefinden der Versuchstiere war während der gesamten Versuchsphase ungestört und das Blut wies trotz mehrfacher Anwendung der Natriumzitat-Pufferlösung als Blocklösung für den Venenverweilkatheter keine makroskopischen Anzeichen einer Hämolyse, wie beispielsweise eine hellere Färbung, auf. Auch trat im Laufe einer Versuchsreihe keine kontinuierliche Zu- oder Abnahme der gemessenen CORT-Konzentrationen auf und in der bestehenden Literatur gibt es keine Hinweise auf eine Beeinflussung der CORT-Werte durch Natriumzitat. Somit ist davon auszugehen, dass die vorliegenden Ergebnisse nicht durch das zur Antikoagulation verwendete Natriumzitat beeinflusst wurden.

VIII.2 Einfluss der Narkose sowie der Probennahme auf Kortikosteron

Der anfänglich erhöhte Wert bei zehn Hennen und der leichte Anstieg bei den restlichen zwei Hennen lassen sich auf die Transportbelastung während des zweiminütigen Transports zum nahegelegenen Operationssaal und auf die anschließende Isofluran-Inhalationsnarkose sowie die Aufwachphase zurückführen. Studien an Mäusen und Ratten haben über erhöhte CORT-Spiegel bis zu vier Stunden nach der Isofluran-Anästhesie berichtet (Jacobsen et al. 2012; Bekhbat et al. 2016). Das Ausmaß der

Stressreaktion scheint jedoch auch von der individuellen Physiologie und Persönlichkeit der Tiere abzuhängen (Carere und Eens 2005; Beuving und Vonder 1986; Cockrem 2007).

Eine völlige Vermeidung von Stress für Versuchstiere während einer experimentellen Phase ist nicht realistisch. Dennoch kann ein vorheriges Training von Versuchstieren zu einem Gewöhnungseffekt mit deutlicher Reduktion von Stressreaktionen bzw. -empfinden und somit zu einem verringerten Einfluss auf die CORT-Konzentrationen führen (Webb und Mashaly 1984). In Anbetracht dessen, dass bei der hier durchgeführten Studie eine signifikante zirkadiane CORT-Rhythmik bei Legehennen nachgewiesen wurde, ist davon auszugehen, dass die Handhabung der Versuchstiere, die Fixierung sowie die Blutentnahme keinen Distress verursacht haben oder die Stresssituation nicht lang genug anhielt, um die zirkadiane Rhythmik von CORT zu unterdrücken (Hillebrecht et al. 2024). Mit zunehmender Fixationsdauer während der Probennahme ist ein Anstieg der CORT-Level im Blutplasma zu erwarten (Korte et al. 1997). Bekannterweise steigen basale CORT-Level 45 Sekunden bis 3 Minuten nach Stressorexposition an (Beuving und Vonder 1978; Wingfield et al. 1982). In dieser experimentellen Studie korrelierte die Zeit zwischen dem Fangen und der Blutentnahme nicht positiv mit den CORT-Peaks (*Publikation, Supplementary Material, Tables S 10 und S 11*). 65,6 % der CORT-Peaks waren mit einer Beprobungsdauer \leq drei Minuten, darunter 4,7 % innerhalb einer Minute, und 31,3 % mit einer Zeitspanne $>$ drei Minuten verbunden (*Publikation, Supplementary Material, Table S 1*). Aufgrund fehlender Videoaufzeichnungen der Blutentnahme konnten allerdings 3,1 % der CORT-Peaks nicht der Beprobungsdauer zugeordnet werden. Es konnten basale CORT-Werte mit einer durchschnittlichen Beprobungsdauer von 2,5 Minuten erhoben werden, wenn man den häufig zitierten CORT-Anstieg nach drei Minuten für die Auswertung zu Grunde legt (Wingfield et al. 1982; Dickens et al. 2012; Hillebrecht et al. 2024). Die Entnahme der Blutproben innerhalb von 45 Sekunden (Beuving und Vonder 1978) war mit dem Einfangen und Fixieren der Legehennen und dem Spülen des Venenkatheters für die Probennahme nicht durchführbar, da sich die Tiere während des Versuchs in den ausgestalteten Volieren frei bewegen konnten und für die Beprobung zunächst in einen angrenzenden Raum verbracht wurden. Bei 15 Blutproben wurden CORT-Peaks gefunden, bei welchen innerhalb von 30 Minuten vor Probennahme kein eindeutiger Distress aufgefallen war oder bei denen die Probennahme länger als drei Minuten dauerte. Dies kann auf eine manipulations- oder

handhabungsbedingte Erhöhung durch die Blutprobennahme hinweisen. Anhand der vorliegenden Daten konnte aber keine eindeutige Zuordnung erfolgen, ob es sich tatsächlich um manipulations- bzw. handhabungsbedingte oder vielmehr um physiologisch erhöhte Werte handelte.

VIII.3 Wechselwirkung von Verhalten und Kortikosteron

Distress ist der Ausdruck für negativen Stress, der einen Organismus stark fordert und eine so ausgeprägte Stressreaktion hervorruft, dass die Gesundheit negativ beeinflusst werden kann. Daher ist es kaum verwunderlich, dass im Rahmen der Frage des Tierwohls häufig die Auswirkungen von Distress und Möglichkeiten zur Vermeidung sowie geeignete Messmethoden zum Nachweis des Ausmaßes untersucht wurden, hierunter auch der Zusammenhang von Distress und Glukokortikoiden wie CORT (Creel 2001; Cockrem 2007; Carvalho et al. 2018).

So beschrieben Carvalho et al. (2018), dass sozial instabile Gruppen von Legehennen eine geringere Produktivität aufweisen und aggressive Verhaltensweisen häufiger auftreten als bei sozial stabilen Gruppen. Dabei wurden die Hennen auf je drei sozial stabile sowie instabile Gruppen aufgeteilt und innerhalb der Gruppen drei verschiedenen Rängen zugeordnet: dominant, mittel und untergeordnet. Dominante Hennen legten die meisten sowie schwersten Eier, während die mittleren Hennen in allen Versuchsgruppen die höchsten Konzentrationen an Glukokortikoidmetaboliten (GCM) aufwiesen (Carvalho et al. 2018). Die drei für die Versuche verwendeten Tiergruppen in dieser Studie zeigten zwar eine sozial stabile Gruppendynamik, jedoch war eine Rangzuordnung der einzelnen Tiere nicht möglich, da diese durch die Verwendung der gelben Warnwesten und ähnlicher Gefiederfarben kaum voneinander zu unterscheiden waren und die Vokalisationen keine Rückschlüsse auf die Rangordnung zuließen (Hillebrecht et al. 2024). In sozial instabilen Gruppen wiesen dominante Tiere höhere GCM-Konzentrationen auf als untergeordnete Tiere, wohingegen bei sozial stabilen Gruppen untergeordnete Hennen höhere GCM-Werte zeigten als dominante Hennen (Carvalho et al. 2018). Hennen mit erhöhten GCM-Werten zeigten des Weiteren eine Tendenz zur Abnahme der Legerate. Allerdings wurden hier die untersuchten Metaboliten nicht weiter spezifiziert. Bei den Versuchen zur Ermittlung des zirkadianen CORT-Profiles beim weiblichen Haushuhn konnte aufgrund der kurzen

Untersuchungszeit von drei Tagen keine Abnahme der Legerate beobachtet werden (Hillebrecht et al. 2024). Innerhalb der drei Gruppen waren deutliche Unterschiede der CORT-Konzentrationen zwischen den einzelnen Legehennen erkennbar, doch diese konnten nicht in Relation zur Rangordnung gesetzt werden, da, wie zuvor beschrieben, eine Einordnung der Hennen nicht möglich war.

Die Auswertung des aufgenommenen Video- und Audiomaterials im Zusammenhang mit den CORT-Peaks ergab, dass in den meisten Fällen keine Korrelation zwischen CORT-Anstieg und Dominanzverhalten bestand (bei 76,6 %) (Hillebrecht et al. 2024). Bei 15,6 % hingegen beruhte die erhöhte CORT-Konzentration auf vorangegangenem Dominanzverhalten oder akutem, handhabungsbedingtem Distress (< 30 Minuten vor der Blutprobennahme) (*Publikation, Supplementary Material, Table S2*) (Hillebrecht et al. 2024). Nur 29,6 % aller gemessener CORT-Werte stellten Peaks dar und von diesen waren wiederum lediglich 15,6 % mit Distress assoziiert. Dieses Ergebnis lässt in Kombination mit der fehlenden Korrelation zwischen der Beprobungszeit bei der Blutentnahme und den CORT-Peaks darauf schließen, dass die täglichen CORT-Schwankungen bis auf wenige, Distress-assozierte Ausnahmen physiologische Fluktuationen darstellen.

Der Großteil der Hennen wies bei Auswertung der ermittelten CORT-Konzentrationen Erhöhungen zwischen 12:00 Uhr und 16:00 Uhr auf, welche möglicherweise auf Konkurrenzverhalten innerhalb der Herde zurückzuführen sein können. Vorwiegend erfolgte die Eiablage bis 11:00 Uhr, weshalb es bis zu dieser Uhrzeit wenig Konkurrenz mit den anderen Herdenmitgliedern um Ressourcen wie Futter und Wasser gab, was eine potenzielle Erklärung für die niedrigeren CORT-Konzentrationen am Morgen und den Anstieg ab mittags aufgrund von erlebtem Dominanzverhalten wäre (Hillebrecht et al. 2024). Die Hennen Nr. 2 und 5 wurden am häufigsten von den anderen Hennen verjagt bzw. bepickt. Beide Hennen hatten eine hellere Gefiederfarbe als die anderen Herdenmitglieder, was Picken und Drohverhalten fördern könnte, da sie sich phänotypisch deutlich von den anderen Individuen unterschieden und dies einen visuellen Reiz bot (Bright 2007; Keeling et al. 2004). Trotz des häufig erlebten Dominanzverhaltens wiesen sie aber keine höheren CORT-Konzentrationen als die anderen Herdenmitglieder auf und somit konnte bei ihnen eine im Vergleich zu den dominanteren Tieren erhöhte, mit Distress verbundene Belastung durch das erlebte Dominanzverhalten ausgeschlossen

werden (Hillebrecht et al. 2024). Andere mögliche Ursachen für das aufgezeichnete CORT-Muster sind nicht verhaltensassoziiert und werden daher separat diskutiert.

VIII.4 Wechselwirkung von Reproduktion und Kortikosteron

Die Auswirkungen von CORT auf die Ovarien und die Ovulation sind bisher unklar, da sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Effekte beschrieben wurden (Johnson 2015). Der Akt der Eiablage selbst scheint auch eine Rolle bei der Erhöhung von CORT zu spielen und es wird vermutet, dass Östrogene, Progesteron und das LH mit seinem Peak ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die Erhöhung von CORT nach der Eiablage haben (Beuving und Vonder 1981; Buntin 1996; Silver et al. 1974; Sockman und Schwabl 1999). Der LH-Peak sowie die Wirkung von Mesotocin und Arginin-Vasotocin fördern Muskelkontraktionen im Ovidukt, die für die Eiablage erforderlich sind (Takahashi und Kawashima 2008). Eine Hemmung der LH-Sekretion kann durch dauerhaft erhöhte CORT-Spiegel im Blut induziert werden, was wiederum zu niedrigeren Sexualsteroidkonzentrationen führt und somit die weitere Eibildung und Eiablage beeinträchtigt (Connolly und Callard 1987; Goutte et al. 2010).

Elf von zwölf Hennen (exklusive Henne Nr. 10) erreichten die Geschlechtsreife vor Versuchsbeginn und legten während der Versuchsphase täglich ein Ei (Hillebrecht et al. 2024). Dies wurde vor und während der Versuchsperiode visuell überprüft. Allerdings waren die Eiablagen auf den Videoaufnahmen nicht immer zu erkennen und konnten den einzelnen Hennen aus den Gründen nicht zugeordnet werden, die bereits in *VIII.3 Wechselwirkung von Verhalten und Kortikosteron* erläutert wurden. Interessanterweise begann Henne Nr. 10 erst zwei Wochen nach der experimentellen Phase mit der Eiablage und wies zudem die niedrigsten CORT-Werte aller Tiere mit beinahe keinen Peaks auf. Dies legt nahe, dass CORT entweder erst ab Erreichen des sexuell maturen Alters eine zirkadiane Rhythmik entwickelt oder sogar ein direkter Zusammenhang mit der Eiproduktion bestehen kann, obwohl bislang keine eindeutigen Beweise hierfür vorliegen. Die anderen elf Hennen wiesen zwischen einem und zwei CORT-Peaks am Tag auf (Hillebrecht et al. 2024). Da aus dem Plasma keine reproduktionsassoziierten Hormone wie Östrogene, Progesteron, LH oder Testosteron gemessen

wurden, lassen die vorliegenden Daten keine weitere Interpretation im Zusammenhang mit der Reproduktion zu. Dies sollte in weiteren Studien im Detail untersucht werden.

Distress zeigt aber nicht nur einen direkten negativen Effekt auf Vögel, sondern auch auf den Phänotyp sowie auf das Verhalten von deren Nachwuchs, sofern während der Eiproduktion Distress mit erhöhten CORT-Konzentrationen erlebt wird (Groothuis et al. 2005; Rettenbacher et al. 2009; Saino et al. 2005). Werden beispielsweise Hühnerembryonen erhöhten maternalen CORT-Leveln in-ovo ausgesetzt, so führt dies zu erhöhten CORT-Konzentrationen bei den Hühnerküken, einer langsameren Reduktion von CORT-Erhöhungen nach Stressreaktionen und gesteigertem oxidativen Stress bei juvenilen Tieren, was wiederum mit einem gesteigerten Risiko für altersbedingte Erkrankungen verbunden ist (Hausmann et al. 2012; Ahmed et al. 2014; Hausmann und Marchetto 2010). Neben einer erhöhten embryonalen Mortalität können Küken mit erhöhten CORT-Konzentrationen ein geringeres Schlupfgewicht aufweisen (Heiblum et al. 2001; Janczak et al. 2006; Eriksen et al. 2003; Saino et al. 2005). Ab der ersten Lebenswoche zeigten sie eine Verringerung der Wachstumsrate, vermehrt aggressive oder ängstliche Verhaltensweisen sowie eine verminderte Kompetitionsfähigkeit (Janczak et al. 2006; Ahmed et al. 2014; Eriksen et al. 2003; Lay und Wilson 2002). Damit verbunden war neben erhöhten CORT-Werten auch eine verringerte Expression der Neuropeptide Arginin-Vasotocin (AVT) und CRH und ein deutlich geringerer Gehalt an Glukokortikoidrezeptor (GR) - Protein im Hypothalamus (Ahmed et al. 2014). Waren die Hühnerembryonen hohen Dosen CORT ausgesetzt, so kam es neben den zuvor beschriebenen Auswirkungen zu weiteren Effekten auf das serotonerge System wie einer erhöhten Aufnahme von Serotonin (5-HT) in die Blutplättchen und einer Senkung der gesamten Serotonin-Konzentration im Blut. Die hypothalamischen Level der Tryptophan-Hydroxylase (TPH) mRNA waren erniedrigt, dafür stiegen die Level des 5-HT Rezeptors 1A (5-HTR1A) und der Monoaminoxidase A (MAO-A) - mRNA an, jedoch nicht die der Monoaminoxidase B (MAO-B) (Ahmed et al. 2014). Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine erhöhte CORT-Exposition im embryonalen Alter zu aggressivem Verhalten bei Hühnern führen kann durch Änderungen in der HPA-Achse sowie im serotonergen System (Summers und Winberg 2006; Leonard 2006).

Die Rolle von CORT bei parentalem Verhalten ist bislang nicht hinreichend geklärt. Einerseits gibt es Studien, die auf einen negativen Einfluss von CORT auf das Brutverhalten zugunsten der Futtersuche

hinweisen (Astheimer et al. 1992; Tsipoura et al. 1999). Andere Studien zeigen, dass ein erhöhter CORT-Plasmaspiegel die Futtersuche der Elterntiere fördert und folglich zu einem höheren Körpergewicht der Küken führt, was einen Fitnessvorteil darstellt (Crossin et al. 2012). Mehrere Studien stimmen jedoch darin überein, dass Vögel mit hohen CORT-Spiegeln vermehrt Nahrung aufnehmen und auf Nahrungssuche gehen (Crossin et al. 2012; Nasir et al. 1999; Koch et al. 2002).

Mit Distress verbundenes Verhalten bei der Reproduktion – sowohl bei dem Brüten, bei der Versorgung des Nachwuchses als auch während der juvenilen Phase nach dem Schlupf erlebt – konnte mit dem vorliegenden Versuchskonzept nicht untersucht werden. Die Legehennen waren adult und befanden sich in der sexuell maturen Phase, zeigten aber keine Anzeichen von Brutverhalten, da sie nach der Eiablage sofort das Nest verließen. Parentales Verhalten trat nicht auf, da kein Nachwuchs vorhanden war.

VIII.5 Einfluss der Photophase und der Jahreszeit auf Kortikosteron

Die hier beschriebene Studie steht teilweise im Gegensatz zu früheren Studien bei anderen Vogelarten, da bei statistischer Auswertung der gesamten CORT-Werte aller Hennen die höchsten Werte zwischen 12:00 Uhr und 16:00 Uhr und nicht nachts kurz vor oder während der Dämmerung gemessen wurden (Etches 1979; Breuner et al. 1999; Romero und Ramage-Healey 2000; Rich und Romero 2001; Tarlow et al. 2003; Schwabl et al. 2016; Hillebrecht et al. 2024). Vereinzelt waren Peaks um 04:00 Uhr oder 08:00 Uhr darstellbar, welche den zuvor beschriebenen Tagesmustern anderer Vogelarten mit Spitzenkonzentrationen nachts vor oder während der Dämmerung entsprechen (Breuner et al. 1999; Joseph und Meier 1973; Hillebrecht et al. 2024). Die erhöhten CORT-Konzentrationen am Mittag stimmen mit einer früheren Studie bei Masthähnchen überein (de Jong et al. 2001; Hillebrecht et al. 2024). Untersuchungen bei Truthühnern, die ebenfalls zur Ordnung Galliformes gehören, ergaben ein zirkadianes Muster mit zwei CORT-Peaks pro Tag unter einem 14L:10D-Lichtregime (Proudman 1991), obwohl das CORT-Profil aus Messungen bei verschiedenen Tieren ermittelt wurde. Der höchste CORT-Peak trat in der Mitte der Photophase auf und ein zweiter

kleinerer Peak während der Skotophase, vergleichbar mit den vorliegenden CORT-Daten der Legehennen (Hillebrecht et al. 2024).

Bei der getrennten statistischen Auswertung jeder Gruppe zeigten die Hennen der Gruppe eins (Hennen Nr. 1 bis 4) signifikante, höchste mittlere CORT-Konzentrationen um 16:00 Uhr ($p < 0,05$) und eine niedrigere zweite, nicht signifikante Spitze um 00:00 Uhr ($0,07 < p < 0,87$) (*Publikation, Supplementary Material, Figure S4*) (Hillebrecht et al. 2024). Der Effektmodell-Plot für die Hennen der Gruppe zwei (Hennen Nr. 5 bis 8) zeigte einen kontinuierlichen Anstieg zwischen 20:00 Uhr und 8:00 Uhr früh, gefolgt von einem Rückgang ohne signifikante Erhöhungen (*Publikation, Supplementary Material, Figure S5*) (Hillebrecht et al. 2024). Gruppe drei (Hennen Nr. 9 bis 12) hatte einen signifikanten Anstieg um 12:00 Uhr ($p < 0,05$). Danach nahmen die CORT-Konzentrationen bis 08:00 Uhr morgens kontinuierlich ab (*Publikation, Supplementary Material, Figure S6*) (Hillebrecht et al. 2024). Da alle Gruppen während der Experimente durch die Tageslichtfenster unter natürlichem Lichteinfluss gehalten wurden, variierte die Dauer der Photophase zwischen den Gruppen: 15L:9D (Juli, Gruppe eins), 14L:10D (August, Gruppe zwei) und 11L:13D (September/Oktober, Gruppe drei). Unabhängig von der Dauer der Photophase zeigte jede Gruppe wie zuvor beschrieben einen statistisch signifikanten CORT-Peak oder zumindest eine Tendenz zu einem CORT-Peak. Bei Betrachtung der gemessenen CORT-Konzentrationen der einzelnen Hennen zeigten alle Gruppen deutliche Erhöhungen während der Nacht und am Tag (*Publikation, Figures 2-4*) (Hillebrecht et al. 2024). In den Gruppen eins und drei traten die Peaks über alle Tageszeiten verteilt auf, zumeist jedoch entweder zwischen 00:00 Uhr und 04:00 Uhr oder zwischen 12:00 Uhr und 16:00 Uhr. Im Gegensatz dazu zeigten die Hennen der Gruppe zwei oftmals Spitzenwerte um 04:00 Uhr morgens, doch auch wiederholt um 20:00 Uhr. Andere Zeitpunkte bildeten für die Gruppe zwei kein generell erkennbares Muster ab. Es konnte für die drei Gruppen kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Dauer beziehungsweise Beginn der Photophase und dem Zeitpunkt der Peaks festgestellt werden (Hillebrecht et al. 2024).

Das Hormon Melatonin wird in den Pinealozyten der Zirbeldrüse (*Glandula pinealis*) gebildet und wirkt als Taktgeber für den zirkadianen Rhythmus der Vögel (Bentley 2001; Zeman und Herichová 2011). Es ist ein natürlicher Antagonist von CORT und nimmt während der Photophase ab, weshalb der in

dieser Arbeit beschriebene CORT-Peak zur Mittagszeit ein physiologisches Ergebnis des Melatonin-Rhythmus sein kann (Gwinner und Brandstätter 2001). Jedoch ist bei einer chronischen CORT-Exposition bei Hühnern die komplette Unterdrückung der zirkadianen Rhythmik von Melatonin möglich (Yang et al. 2022b). Physiologisch zeigt CORT eine biphasische Wechselwirkung mit Melatonin, mit einer stimulierenden Wirkung von CORT während der Photophase, verbunden mit niedrigen Melatonin-Werten, und einer inhibitorischen Wirkung von CORT während der Skotophase mit hohen Melatonin-Werten (Yang et al. 2022b). Die stimulierende Wirkung von CORT auf die Zirbeldrüse (Glandula pinealis) erfolgt über die Aktivierung verschiedener Adrenozeptoren (ADR) (ADR β oder ADR α 1 + ADR β) (Fernandes et al. 2017). Chronischer Stress mit erhöhten CORT-Leveln kann zu einer Verminderung der CRH-Sekretion während der Skotophase führen und somit eine Störung der Tagesrhythmik verursachen (Yang et al. 2022b). So kann beispielsweise eine konstante Lichtexposition bei juvenilen Hühnern die Melatoninsekretion unterdrücken und den zirkadianen Rhythmus stören, was mit erhöhten CORT-Spiegeln einhergeht (Yang et al. 2022a). Niedrige Melatoninspiegel wiederum stehen in Zusammenhang mit Depressionen und Stressverhalten (Tchekalarova et al. 2018). Eine höhere Lichtintensität (≥ 30 Lux) erhöht die Häufigkeit von Federpicken und die Mortalität und somit den Distress bei Hennen, wobei angenommen wird, dass künstliches Licht mit inadäquatem Spektrum oder zu hoher Lichtintensität (Lux) einer der wichtigsten Auslöser für Kannibalismusverhalten darstellt (Kjaer und Vestergaard 1999; Shi et al. 2019). Im Vergleich zu künstlichem Licht wird berichtet, dass natürliches Licht die CORT-Serumspiegel senkt, was offenbar mit dem enthaltenen ultravioletten Licht zusammenhängt (Fouda et al. 2018; Sobotik et al. 2020).

Die Werte für freies CORT aus dem Blutplasma sind nicht immer als aussagekräftig genug einzuschätzen, da die Bindungsfähigkeit des Transcortins (CBG) je nach Jahreszeit variieren kann und diesbezüglich auch die Menge des CBG-gebundenen CORT (Breuner et al. 2003). Aviäres CBG reguliert durch Bindung die biologische Aktivität von Glukokortikoiden und ist entscheidend für die Regulierung von Stressreaktionen, wobei hier sowohl physiologische als auch verhaltensbezogene Reaktionen gesteuert werden (Lin et al. 2021). Einzigartig im Vergleich zu anderen Vertebraten ist seine Funktion als Ersatz für Sexualhormon-bindendes Globulin (SHBG), indem CBG im Blut befindliche Androgene, Östrogene und Progesteron binden und hierdurch dessen Bioverfügbarkeit

steuern kann. Bei Vögeln wie unter anderem der Winterammer (*Junco hyemalis*) oder Felsentauben (*Columba livia*) scheint, anders als bei anderen Vertebraten, das Gen für das SHBG, welches sonst den Transport von Sexualhormonen übernimmt, zu fehlen (Deviche et al. 2001; Wingfield et al. 1984). Häufig wird die saisonale Auswirkung auf das CBG bei migrierenden Singvögeln wie der Winterammer untersucht, da bei diesen CBG-anhängige CORT-Fluktuationen mit erlebtem Migrationsstress in Verbindung stehen (Deviche et al. 2001). Jedoch ist das Vorkommen und die Funktion von CBG bei Hühnern bisher kaum untersucht (Vashchenko et al. 2016; Gould und Siegel 1978). Bei der Untersuchung auf das Vorliegen einer zirkadianen Rhythmik beim Haushuhn wurden saisonale Effekte nicht betrachtet, da die Versuchsphasen kurz nacheinander stattfanden und das Haushuhn nicht zu den migrierenden Vögeln mit annehmbaren saisonalen CBG-Schwankungen zählt (Hillebrecht et al. 2024).

VIII.6 Beeinflussung blutanalytischer Parameter durch Kortikosteron

Die Bestimmung des Blut-CORT bei Vögeln ist derzeit keine gängige Praxis in der klinisch angewandten Diagnostik, da die Bestimmung kostenintensiv und die Anwendung eines RIAs für eine schnelle Diagnosestellung zu zeitintensiv ist. Regelmäßige Blutanalysen umfassen jedoch die Bestimmung der Leukozytenzahl und eine vorliegende Leukozytose kann dabei unter anderem stressbedingt sein (Davis et al. 2008; Scanes 2015). Sowohl eine Neutrophilie als auch eine Lymphopenie können stressinduziert vorliegen (Davis et al. 2008). Eine Kombination aus Messung von CORT und Leukozytenzahl hilft zu klären, ob eine vorliegende Leukozytose stress- oder krankheitsbedingt ist. Bei Distress können sowohl eine Leukozytose mit erhöhten CORT-Leveln als auch eine Erhöhung von CORT in Kombination mit einer Leukopenie oder Normozytose vorliegen (Davis et al. 2008). Eine Leukozytose ohne Erhöhung der CORT-Werte kann entweder auf eine krankheitsbedingte Leukozytose oder auf chronischen Distress mit herunterregulierter CORT-Ausschüttung hindeuten (Davis et al. 2008; Rich und Romero 2005). Ergänzend kann das H:L - Verhältnis als zusätzlicher Parameter für die Bestimmung von akutem Distress herangezogen werden (El-Lethey et al. 2000; Cotter 2015; Matur et al. 2015; Weimer et al. 2018).

Auch einige andere Parameter der klinischen Diagnostik werden durch erhöhte CORT-Konzentrationen beeinflusst. Erhöhte Glukosewerte (Referenz 227 – 300 mg/dL) können aufgrund einer CORT-induzierten, erhöhten Glukoneogenese und Glykogenolyse gefunden werden (Remage-Healey und Romero 2000; Brown et al. 2021; Carpenter und Marion 2018). Ebenso können aufgrund von erhöhten CORT-Konzentrationen die Kreatininwerte oberhalb der physiologischen Referenzwerte liegen (Referenz 0,9 – 1,8 mg/dL) (Carpenter und Marion 2018; Zaytsoff et al. 2019). Veränderungen im Lipidstoffwechsel als Reaktion auf erhöhte CORT-Werte führen beispielsweise bei Hühnern zu einer Fettleber (*Steatosis Hepatitis*) und können erhöhte Gallensäuren im Serum bewirken, welche sich labordiagnostisch ermitteln lassen (Zaytsoff et al. 2019; Cray et al. 2008; Hu et al. 2017; Hu et al. 2018).

Einzelne Laborparameter können in keinem Fall als alleiniger Nachweis für eine Stressreaktion von Vögeln gesehen werden, sondern müssen immer in der Gesamtheit aller vorliegender Anhaltspunkte analysiert werden. So ergibt zunächst eine eingehende tierärztliche Anamnese in Zusammenhang mit

einer direkten Beobachtung der zu untersuchenden Vögel zumeist einen konkreten Hinweis auf vorliegenden Distress, sowohl akuten als auch chronischen. Vögel verstecken Anzeichen von Erkrankungen häufig bis zum Schluss. Dennoch können ein bereits vom Besitzer beobachtetes, unruhiges Verhalten, Polypnoe oder Federrupfen akute Anzeichen von Distress sein, wohingegen bei chronischem Distress das Immunsystem supprimiert sein kann oder auch hier Schäden am Gefieder aufgrund von kontinuierlichem Federrupfen bei sich selbst oder Federpicken durch verpaarte Tiere auffallen können. (El-Lethey et al. 2000; Owen und Lane 2006; Carere und van Oers 2004; Queiroz und Cromberg 2006; Sapolsky et al. 2000; Schmidt und Soma 2008). Oft lässt sich in der Anamnese bereits eine Ursache wie beispielsweise der Tod des Partnertiers oder ein Neuzugang im Bestand mit daraus resultierender Verhaltensauffälligkeit bzw. -störung wie Federpicken eruieren. Je mehr (labordiagnostische) Parameter einander schließlich ergänzen, desto sicherer gestaltet sich die Feststellung beziehungsweise Beurteilung einer Stressreaktion bei Vögeln.

VIII.7 Kortikosteron in der Stressbeurteilung

Unsere Daten bilden eine Grundlage für einen möglichen Parameter zur Einschätzung von Stressreaktionen bei Haushühnern. Im Blut gemessene CORT-Werte scheinen bei Einhaltung eines Zeitfensters von drei Minuten für die Blutentnahme verlässliche, basale Werte zu liefern, vorausgesetzt es gab innerhalb von 30 Minuten vor der Probennahme keine längere Stressorexposition (Hillebrecht et al. 2024). Zu vermeiden ist vor einer CORT-Messung möglichst, dass die Tiere unbekanntem bzw. ungewohnten Stressfaktoren ausgesetzt werden, wie beispielsweise langen Transportzeiten oder langer Handhabung durch fremde Personen, was die Aussagekraft der Hormonmessung mindern könnte. Sind die Tiere an den Transport nicht gewöhnt, wie beispielsweise in Intensivtierhaltungen, oder ist ein Transport aufgrund anderer Umstände nicht möglich, sollte die Blutentnahme vor Ort durch geschultes Personal erfolgen. Zu beachten ist, dass das Fangen einzelner Tiere auch für die restlichen Herdenmitglieder einen großen Stressfaktor darstellen kann. Dementsprechend sollten die ausgewählten Tiere nach Möglichkeit von mehreren geschulten Personen gleichzeitig oder in kurzen Abständen nacheinander beprobt werden.

Die initial erhöhten CORT-Werte über 5000 pg/ml bei dem Großteil der Versuchstiere dieser Studie wiesen auf eine akute Distress-Situation hin und waren im Zeitverlauf nur bei wenigen Individuen reproduzierbar (14,35 % aller Messwerte > 5000 pg/ml) (*Tabelle 1*) (Hillebrecht et al. 2024). Zurückzuführen waren diese ausgeprägten initialen Erhöhungen – bis sechs Stunden nach Beginn des Versuchs – auf die Prozedur der Venenkatheterinsertion inklusive vorangegangenem Transport in den nahegelegenen Operationssaal sowie die hierfür notwendige Inhalationsanästhesie mit Isofluran (Jacobsen et al. 2012; Bekhbat et al. 2016).

Einzelne Hennen können aufgrund ihrer individuellen Physiologie höhere basale CORT-Werte oder eine erhöhte Stressempfänglichkeit aufweisen (Bézières et al. 2019). Es ist anzunehmen, dass Werte unter 5000 pg/ml hierbei noch intensiver von individuellen Unterschieden betroffen sind, da sie in Abhängigkeit vom Individuum sowohl reproduzierbare, physiologische Schwankungen als auch einmalige stressbedingte Erhöhungen darstellen können.

Wie zuvor bei den laboranalytischen Parametern erwähnt, ist die Betrachtung eines einzelnen Parameters für die Beurteilung von Stressreaktionen nicht ausreichend. Bei der Auswertung

vorliegender CORT-Werte sind – wie in den Abschnitten zuvor ausgeführt – physiologische Einflüsse wie ein Zusammenhang mit der Reproduktion, den Lichtverhältnissen sowie die vorliegende zirkadiane Rhythmik zu beachten.

Derzeit findet die CORT-Messung im klinisch orientierten Alltag keine Anwendung. Für eine bessere Anwendbarkeit der CORT-Messung in der Praxis können anstelle einer zeitaufwändigen Messung mittels RIA auch kommerzielle ELISA-Kits verwendet werden, welche jedoch finanziell kostspielig sind. Allerdings sind nur wenige von ihnen (z. B. Corticosterone ELISA-Kit, Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, New York, Vereinigte Staaten von Amerika) für die Messung von Vogel-CORT geeignet oder validiert (Häffelin et al. 2021).

Im Hinblick auf die Anwendbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse gibt es in der Geflügel-Intensivhaltung, aber auch in der Hobbyhaltung, viele Möglichkeiten die CORT-Messung zur Beurteilung des Tierwohls einzusetzen. So können beispielsweise Haltungssysteme mit ungeeigneter Beleuchtung, schlechter Luftqualität, zu hohen Temperaturen, zu hohen Besatzdichten, fehlendem Enrichment zur Förderung des Erkundungs- und Futtersuchverhaltens sowie eine nicht bedarfsgerechte Fütterung zu Distress bei den Tieren führen (Chen et al. 2019), wobei eine CORT-Messung zur Evaluierung des Distress-Niveaus der Tiere angewendet werden könnte. Aus inadäquaten Haltungsbedingungen können Verhaltensauffälligkeiten wie Federpicken oder Kannibalismus resultieren, die zu erhöhtem Tierleid, erhöhter Futteraufnahme mit reduzierter Gewichtszunahme und erhöhter Sterblichkeit führen können (El-Lethey et al. 2000; Shi et al. 2019; Kjaer und Vestergaard 1999). Neben den gravierenden Auswirkungen auf das Tierwohl entsteht durch die beschriebenen Umstände ein hoher wirtschaftlicher Schaden. Bereits die Verwendung von Stroh als Einstreumaterial und die Fütterung von Futtermehl anstelle von Pellets kann jedoch das Tierwohl deutlich verbessern und Federpicken reduzieren (El-Lethey et al. 2000). Eine langfristige CORT-Erhöhung wirkt sich ferner auf die Gesundheit aus, indem sie eine Immunsuppression verursacht und somit die Anfälligkeit für Krankheiten erhöht (Sapolsky et al. 2000; Schmidt und Soma 2008; Zaytsoff et al. 2019).

Nicht nur im direkt angewendeten Tierschutz, sondern auch in der Legislative, sind Werkzeuge zur Beurteilung des Tierwohls, wie zum Beispiel die CORT-Messung, von großem Interesse. So können

Referenzwerte erstellt und für die Überprüfung des Tierwohls angewendet werden. Auch sind verschiedene Gutachten zu Mindestanforderungen wie beispielsweise an die Haltung von Straußen, Nandus, Emus und Kasuaren, an die Haltung von Greifvögeln und Eulen oder an die Haltung von Papageien sowie die Europaratsempfehlungen für die Haltung von Haushühnern zu einem gewissen Anteil veraltet und sollten überholt werden (BMEL 1995a, 1995b, 1995c, 2019). Hierbei können CORT-Messungen als Werkzeug ergänzend eingesetzt werden.

VIII.8 Ausblick

Die in unserer explorativen Studie zur Verifizierung des Vorliegens einer zirkadianen CORT-Rhythmik in Legehennen erzielten Ergebnisse dienen als Basis für weitere Grundlagenforschung und liefern gleichzeitig einen Parameter zur Stressbeurteilung bei Legehennen (Hillebrecht et al. 2024). Wir fanden eine signifikante zirkadiane Rhythmik von CORT bei einer Haltung von Legehennen mit sozialen Interaktionen, wobei deutliche interindividuelle Unterschiede auftraten (Hillebrecht et al. 2024). Die geringe Zahl von 12 Versuchstieren war unter Berücksichtigung des 3R-Prinzips gewählt worden, da wir bei über drei Tage wiederholten Messungen signifikante Effekte erwarteten. In zukünftigen Studien sollte die Reproduzierbarkeit der Resultate mit einer erhöhten Tierzahl zur Erhöhung der statistischen Belastbarkeit überprüft werden.

Ursächlich für die zirkadiane Rhythmik kommen sowohl der Einfluss des Lichts als auch reproduktionsassoziierte, physiologische Vorgänge im Organismus in Frage. Die Effekte von verschiedenen Lichtprogrammen, natürlicher und künstlicher Beleuchtung und Lichtintensitäten sowie der aviären Perzeption der Lichtintensität (Gallilux) konnten in unserem Versuch nicht adressiert werden und sollten daher Bestandteil weiterer Studien sein, bei denen parallel die Konzentrationen von CORT, GnRH und Melatonin gemessen werden sollten. Wichtig ist hierbei, dass weniger die Lichtintensität (Lux), sondern vielmehr die Lichtqualität unter Berücksichtigung verschiedener Emissionsspektren und des UV-Anteils für ein erhöhtes Tierwohl von Bedeutung ist (Shi et al. 2019; Sobotik et al. 2020; Fouda et al. 2018).

In einer weiteren Studie sollte die Korrelation von CORT mit der Eibildung und Eiablage erforscht werden, wobei neben CORT auch Östrogene, Progesteron und LH sowie Mesotocin und Arginin-Vasotocin unter Videodokumentation der Eiablagezeit und Kennzeichnung der Individuen gemessen werden sollten zur Untersuchung kausaler Zusammenhänge.

Letztendlich ist es für ein besseres Verständnis physiologischer Vorgänge notwendig, den Einfluss akuter und chronischer Distress-Situationen sowie der jahreszeitlichen Schwankungen von CBG auf die CORT-Konzentrationen zu ergründen. Mögliche saisonale Änderungen der CBG-Bindungskapazität könnten einen entscheidenden Effekt auf die Beurteilung von Stress- bzw. Tierwohlbeurteilungen mit verbundener Messung der CORT-Konzentrationen haben.

Die Beurteilung der Anwendbarkeit unserer ermittelten CORT-Konzentrationen in der Distress-Beurteilung kann durch Integrierung der Messung in die klinische Labordiagnostik im Rahmen regulär anfallender Blutuntersuchungen erfolgen und so zunächst ohne weitere tierexperimentelle Belastungen ausgeführt werden. Hierzu sollte aber zuvor die Zuverlässigkeit und Messgenauigkeit der CORT-Messung durch ein geeignetes ELISA-Kit mittels RIA validiert werden.

Mit dieser Studie wurde nun ein weiterer Grundstein für die Stressbeurteilung bei Haushühnern, hier im Besonderen bei Legehennen, gelegt. Zwar eignet sich eine CORT-Messung nicht als alleiniger Parameter für die Beurteilung von Distress-Zuständen bei Hühnern, doch sie bietet sich unter Berücksichtigung der physiologischen Schwankungen und individueller Unterschiede zwischen den Tieren im zirkadianen Verlauf als ein zuverlässiges Werkzeug zur Bestimmung basaler CORT-Konzentrationen an (Hillebrecht et al. 2024). In Kombinationen mit verschiedenen weiteren blutanalytischen oder verhaltensbeobachtenden Methoden kann der Stresszustand von Hühnern hierdurch gut eingeschätzt werden. Auch für andere Vogelarten wie beispielsweise Strauße (*Struthionidae sp.*) oder Greifvögel (*Accipitriformes sp.*) bietet sich die Überprüfung einer zirkadianen Rhythmik an und sollte als Grundlage für weitere Forschungen oder die Erstellung von Gutachten ausgearbeitet werden.

IX. Zusammenfassung:

Viele Studien haben sich mit der Untersuchung des Stresshormons Kortikosteron (CORT) befasst, dabei jedoch entweder soziale Interaktionen von Hühnern in einer Herde oder individuelle Unterschiede nicht berücksichtigt, indem verschiedene Individuen oder einzeln gehaltene Hühner zur Erstellung eines CORT-Profiles herangezogen wurden. Die Zielsetzung dieser Arbeit war daher, ein CORT-Tagesprofil über drei Tage zu ermitteln unter Berücksichtigung sozialer Interaktionen in einer kleinen Herde. Dafür wurden 12 Legehennen in ausgestalteten Volieren in Vierergruppen gehalten und je zwei Tiere aus einer Herde gleichzeitig beprobt. Die Blutentnahme erfolgte im Verlauf von drei Tagen alle vier Stunden manuell über einen Venenverweilkatheter in der Vena ulnaris, welcher zuvor während einer Inhalationsnarkose mit Isofluran und einer präemptiven Analgesie mit Meloxicam gelegt worden war. Soziale Interaktionen und Vokalisationen wurden mithilfe einer Videokamera sowie individueller Mikrofone auf dem Tierrücken erfasst. Aus dem Blutplasma wurde mittels RIA die Hormonkonzentration von CORT ermittelt und anschließend unter Berücksichtigung der sozialen Interaktionen aus Video- und Audioaufzeichnungen ausgewertet. Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Peak zwischen 12:00 Uhr und 16:00 Uhr ($p < 0,05$) sowie um 00:00 Uhr ($0,12 < p < 0,53$), wobei der letztgenannte nicht signifikant war. Bei 76,6 % der CORT-Peaks war kein Dominanzverhalten erkennbar, 15,6 % standen mit vorangegangenem Dominanzverhalten oder akutem Distress in Verbindung (< 30 Minuten vor Blutprobennahme oder mit Blutentnahme assoziiert) und 7,8 % konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. 65,6 % der aufgetretenen CORT-Peaks waren mit einer Beprobungsdauer \leq drei Minuten assoziiert, darunter 4,7 % innerhalb einer Minute, und 31,3 % mit einer Zeitspanne $>$ drei Minuten. Aufgrund fehlender Videoaufzeichnungen der Blutentnahme konnten 3,1 % der CORT-Peaks nicht der Beprobungsdauer zugeordnet werden. Zwischen den CORT-Werten der einzelnen Hühner gab es zudem deutliche Unterschiede, was sich auf die individuelle Stressempfänglichkeit zurückführen lässt. Die Ergebnisse zeigen, dass einige CORT-Peaks stressassoziiert sind, jedoch die Majorität der CORT-Konzentrationen physiologische Schwankungen darstellt. Weitere Studien müssen die Reproduzierbarkeit der CORT-Werte sowie den Zusammenhang mit der Eiproduktion sowie Eiablage klären. Ebenso ist der Einfluss von akutem und

chronischem Distress sowie von verschiedenen Lichtverhältnissen und -intensitäten als auch der aviären Perzeption von Licht (Gallilux) zu untersuchen.

X. Summary:

Many studies have addressed the research on the stress hormone corticosterone (CORT), but have not considered social interactions of chickens in a flock or individual differences by using different individuals or individually caged chickens to create a CORT profile. The subject of this thesis was therefore to determine a circadian CORT profile over three days, taking social interactions in a small herd into account. For this purpose, 12 laying hens were kept in groups of four in enriched aviaries and two animals from each flock were sampled at the same time. Blood was taken manually every four hours over the course of three days via vein catheter in the vena ulnaris which had previously been inserted during inhalation anesthesia with isoflurane and preemptive analgesia with meloxicam. Social interactions and vocalizations were recorded using a video camera and individual microphones on the animals' back. The concentrations of CORT were determined from the blood plasma using RIA and were then analysed while paying attention to social interactions in the audio and video recordings. Statistical analysis showed a significant peak between 12:00 p.m. and 04:00 p.m. ($p < 0,05$) and at 00:00 a.m. ($0,12 < p < 0,53$), although the latter is not significant. In 76,6 % of the CORT peaks, no dominance behavior was recognizable, 15,6 % were associated with previous dominance behavior or acute distress (< 30 minutes before blood sampling or associated with blood sampling) and 7,8 % could not be clearly assigned. 65,6 % of the occurring CORT peaks were associated with a blood sampling duration of \leq three minutes, including 4,7 % within one minute, and 31,3 % with a duration of > three minutes. Due to a lack of video recordings of the blood sampling, 3,1 % of the CORT peaks could not be assigned to the sampling period. There were also clear differences between the CORT values of the individual chickens which can be attributed to the individual susceptibility to stress. The results show that some CORT peaks were stress-associated, but the majority of CORT concentrations represented physiological fluctuations. Further studies must clarify the reproducibility of the CORT values as well as the connection with oviproduction and oviposition. The influence of acute and chronic distress as well as different lighting conditions and intensities as well as the avian perception of light intensity (Gallilux) also have to be examined.

XI. Literaturverzeichnis:

ABOLINS-ABOLS, M.; HANAUER, R. E.; ROSVALL, K. A.; PETERSON, M. P.; KETTERSON, E. D. (2018): The effect of chronic and acute stressors, and their interaction, on testes function: an experimental test during testicular recrudescence. In: *The Journal of Experimental Biology* 221 (17): jeb180869. DOI: 10.1242/jeb.180869.

AHMED, A. A.; MA, W.; NI, Y.; ZHOU, Q.; ZHAO, R. (2014): Embryonic exposure to corticosterone modifies aggressive behavior through alterations of the hypothalamic pituitary adrenal axis and the serotonergic system in the chicken. In: *Hormones and Behavior* 65 (2), S. 97–105. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2013.12.002.

ANGELIER, F.; MOE, B.; BLANC, S.; CHASTEL, O. (2009): What factors drive prolactin and corticosterone responses to stress in a long-lived bird species (snow petrel *Pagodroma nivea*)? In: *Physiological and Biochemical Zoology: PBZ* 82 (5), S. 590–602. DOI: 10.1086/603634.

ANGELIER, F.; WINGFIELD, J. C.; TROUVÉ, C.; DE GRISSAC, S.; CHASTEL, O. (2013): Modulation of the prolactin and the corticosterone stress responses: do they tell the same story in a long-lived bird, the Cape petrel? In: *General and Comparative Endocrinology* 182, S. 7–15. DOI: 10.1016/j.ygcen.2012.10.008.

ASTHEIMER, L. B.; BUTTEMER, W. A.; WINGFIELD, J. C. (1992): Interactions of Corticosterone with Feeding, Activity and Metabolism in Passerine Birds. In: *Ornis Scandinavica* 23 (3), S. 355-365. DOI: 10.2307/3676661.

AUDACITY (2023): Spectrogram View - Audacity Manual. Online verfügbar unter https://manual.audacityteam.org/man/spectrogram_view.html (Stand 24.03.2024).

BEKHBAT, M.; MERRILL, L.; KELLY, S. D.; LEE, V. K.; NEIGH, G. N. (2016): Brief anesthesia by isoflurane alters plasma corticosterone levels distinctly in male and female rats: Implications for tissue collection methods. In: *Behavioural Brain Research* 305, S. 122–125. DOI: 10.1016/j.bbr.2016.03.003.

BENTLEY, G. E. (2001): Unraveling the enigma: the role of melatonin in seasonal processes in birds. In: *Microscopy Research and Technique* 53 (1), S. 63–71. DOI: 10.1002/jemt.1069.

BEUVING, G.; VONDER, G. M. (1981): The influence of ovulation and oviposition on corticosterone levels in the plasma of laying hens. In: *General and Comparative Endocrinology* 44 (3), S. 382–388. DOI: 10.1016/0016-6480(81)90016-2.

BEUVING, G.; VONDER, G. M. (1978): Effect of stressing factors on corticosterone levels in the plasma of laying hens. In: *General and Comparative Endocrinology* 35 (2), S. 153–159. DOI: 10.1016/0016-6480(78)90157-0.

BEUVING, G.; VONDER, G. M. (1986): Comparison of the adrenal sensitivity to ACTH of laying hens with immobilization and plasma baseline levels of corticosterone. In: *General and Comparative Endocrinology* 62 (3), S. 353–358. DOI: 10.1016/0016-6480(86)90044-4.

BÉZIER, P.; SAN-JOSE, L. M.; ALMASI, B.; JENNI, L.; ROULIN, A. (2019): Baseline and stress-induced corticosterone levels are heritable and genetically correlated in a barn owl population. In: *Heredity* 123 (3), S. 337–348. DOI: 10.1038/s41437-019-0203-5.

BFJ (BUNDESAMT FÜR JUSTIZ) (2001): TierSchNutzTV - Verordnung zum Schutz landwirtschaftlicher Nutztiere und anderer zur Erzeugung tierischer Produkte gehaltener Tiere bei ihrer Haltung. Online verfügbar unter <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschnutztv/BJNR275800001.html> (Stand 24.03.2024).

BMEL (BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT) (1995a):
Europaratsempfehlungen für die Haltung von Haushühnern. Europarat. Online verfügbar unter
https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/_Tiere/Tierschutz/Gutachten-Leitlinien/eu-haltung-huehner.html (Stand 24.03.2024).

BMEL (BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT) (1995b):
Mindestanforderungen an die Haltung von Greifvögeln und Eulen. Online verfügbar unter
<https://www.bmel.de/DE/themen/tiere/tierschutz/haltung-voegel.html> (Stand 24.03.2024).

BMEL (BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT) (1995c):
Mindestanforderungen an die Haltung von Papageien. Online verfügbar unter
<https://www.bmel.de/DE/themen/tiere/tierschutz/haltung-papageien.html> (Stand 24.03.2024).

BMEL (BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT) (2019): Gutachten
über Mindestanforderungen an die Haltung von Straußen, Nandus, Emus und Kasuaren. Online
verfügbar unter https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/_Tiere/Tierschutz/Gutachten-Leitlinien/Gutach-tenMindestanforderungen_Haltung_Straussen_Nandus_Emus_und_Kasuaren.html
(Stand 24.03.2024).

BMEL-STATISTIK (BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT) (2024a):
Tierhaltung Geflügelhaltung. Online verfügbar unter <https://www.bmel-statistik.de/landwirtschaft/tierhaltung/gefluegelhaltung> (Stand 24.03.2024).

BMEL-STATISTIK (BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT) (2024b):
Versorgungsbilanz Eier. Online verfügbar unter <https://www.bmel-statistik.de/ernaehrung/versorgungsbilanzen/eier> (Stand 24.03.2024).

BMEL-STATISTIK (BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT) (2024c): Versorgungsbilanz Fleisch. Online verfügbar unter <https://www.bmel-statistik.de/ernaehrung/versorgungsbilanzen/fleisch> (Stand 24.03.2024).

BOESSNECK, J. (1958): Herkunft und Frühgeschichte unserer mitteleuropäischen landwirtschaftlichen Nutztiere. In: *Züchtungskunde*, Bd. 30. 1. Auflage: Stuttgart Eugen Ulmer Verlag (30), S. 289–296.

BOOGERT, N. J.; LACHLAN, R. F.; SPENCER, K. A.; TEMPLETON, C. N.; FARINE, D. R. (2018): Stress hormones, social associations and song learning in zebra finches. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 373 (1756): 20170290. DOI: 10.1098/rstb.2017.0290.

BRANCO, T.; DE MOURA, D. J.; DE ALENCAR NÄÄS, I.; OLIVEIRA, S. R. M. (2020): Detection of broiler heat stress by using the generalised sequential pattern algorithm. In: *Biosystems Engineering* 199, S. 121–126. DOI: 10.1016/j.biosystemseng.2019.10.012.

BREUNER, C. W.; GREENBERG, A. L.; WINGFIELD, J. C. (1998): Noninvasive corticosterone treatment rapidly increases activity in Gambel's white-crowned sparrows (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). In: *General and Comparative Endocrinology* 111 (3), S. 386–394. DOI: 10.1006/gcen.1998.7128.

BREUNER, C. W.; ORCHINIK, M.; HAHN, T. P.; MEDDLE, S. L.; MOORE, I. T.; OWEN-ASHLEY, N. T.; SPERRY, T. S.; WINGFIELD, J. C. (2003): Differential mechanisms for regulation of the stress response across latitudinal gradients. In: *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 285 (3): R594–600. DOI: 10.1152/ajpregu.00748.2002.

BREUNER, C. W.; HAHN, T. P. (2003): Integrating stress physiology, environmental change, and behavior in free-living sparrows. In: *Hormones and Behavior* 43 (1), S. 115–123. DOI: 10.1016/s0018-506x(02)00020-x.

BREUNER, C. W.; WINGFIELD, J. C.; ROMERO, L. M. (1999): Diel rhythms of basal and stress-induced corticosterone in a wild, seasonal vertebrate, Gambel's white-crowned sparrow. In: *The Journal of Experimental Zoology* 284 (3), S. 334–342. DOI: 10.1002/(SICI)1097-010X(19990801)284:3<334::AID-JEZ11>3.0.CO;2-%23.

BRIGHT, A. (2007): Plumage colour and feather pecking in laying hens, a chicken perspective? In: *British Poultry Science* 48 (3), S. 253–263. DOI: 10.1080/00071660701370483.

BROWN, C. L. J.; ZAYTSOFF, S. J. M.; MONTINA, T.; INGLIS, G. D. (2021): Corticosterone-Mediated Physiological Stress Alters Liver, Kidney, and Breast Muscle Metabolomic Profiles in Chickens. In: *Animals: an open access journal from MDPI* 11 (11): 3056. DOI: 10.3390/ani11113056.

BUNTIN, J. D. (1996): Neural and Hormonal Control of Parental Behavior in Birds. In: Jay S. Rosenblatt (Hg.): Parental care. Evolution, Mechanisms, and Adaptive Significance, Bd. 25. San Diego, Calif.: Acad. Press (Advances in the Study of Behavior, 25), S. 161–213. eBook ISBN: 9780080582863.

CANNON, W. B. (1915): Bodily changes in pain, hunger, fear and rage, an account of recent researches into the function of emotional excitement: New York and London, D. Appleton and Co. ISBN-13: 978-1406755398. Online verfügbar unter <http://resource.nlm.nih.gov/00620620R> (Stand 24.03.2024)

CARERE, C.; EENS, M. (2005): Unravelling animal personalities: how and why individuals consistently differ. In: *Behaviour* 142 (9), S. 1155–1163. DOI: 10.1163/156853905774539436.

CARERE, C.; VAN OERS, K. (2004): Shy and bold great tits (*Parus major*): body temperature and breath rate in response to handling stress. In: *Physiology & Behavior* 82 (5), S. 905–912. DOI: 10.1016/j.physbeh.2004.07.009.

CARPENTER, J. W.; MARION, C. J. (Hg.) (2018): Exotic animal formulary. fifth edition. St. Louis, Mo.: Saunders. ISBN-13: 978-0323444507.

CARSIA, R. V.; WEBER, H.; LAUTERIO, T. J. (1988): Protein malnutrition in the domestic fowl induces alterations in adrenocortical function. In: *Endocrinology* 122 (2), S. 673–680. DOI: 10.1210/endo-122-2-673.

CARSIA, R. V. (2015): Adrenals. In: Colin G. Scanes und Paul D. Sturkie (Hg.): *Sturkie's avian physiology*. 6. ed. Amsterdam: Elsevier, S. 577–611. eBook ISBN: 9780124072435.

CARVALHO, R. R.; PALME, R.; DA SILVA VASCONCELLOS, A. (2018): An integrated analysis of social stress in laying hens: The interaction between physiology, behaviour, and hierarchy. In: *Behavioural Processes* 149, S. 43–51. DOI: 10.1016/j.beproc.2018.01.016.

CASSONE, V. M.; MENAKER, M. (1984): Is the avian circadian system a neuroendocrine loop? In: *The Journal of Experimental Zoology* 232 (3), S. 539–549. DOI: 10.1002/jez.1402320321.

CHEN, S.; XIANG, H.; ZHANG, H.; ZHU, X.; WANG, D.; WANG, J.; YIN, T.; LIU, L.; KONG, M.; LI, H.; ZHAO, X. (2019): Rearing system causes changes of behavior, microbiome, and gene expression of chickens. In: *Poultry Science* 98 (9), S. 3365–3376. DOI: 10.3382/ps/pez140.

CHONG, N. W.; CHAURASIA, S. S.; HAQUE, R.; KLEIN, D. C.; IUVONE, P. M. (2003): Temporal-spatial characterization of chicken clock genes: circadian expression in retina, pineal gland, and peripheral tissues. In: *Journal of Neurochemistry* 85 (4), S. 851–860. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2003.01723.x.

CICOLINI, G.; MANZOLI, L.; SIMONETTI, V.; FLACCO, M. E.; COMPARCINI, D.; CAPASSO, L.; DI BALDASSARRE, A.; ELFAROUKI, G. E. (2014): Phlebitis risk varies by peripheral venous catheter site and increases after 96 hours: a large multi-centre prospective study. In: *Journal of Advanced Nursing* 70 (11), S. 2539–2549. DOI: 10.1111/jan.12403.

COCKREM, J. F. (2007): Stress, corticosterone responses and avian personalities. In: *Journal of Ornithology* (148), S. 169–178. DOI: 10.1007/s10336-007-0175-8.

CONNOLLY, P. B.; CALLARD, I. P. (1987): Steroids modulate the release of luteinizing hormone from quail pituitary cells. In: *General and Comparative Endocrinology* 68 (3), S. 466–472. DOI: 10.1016/0016-6480(87)90086-4.

CORNELIUS, J. M.; BOSWELL, T.; JENNI-EIERMANN, S.; BREUNER, C. W.; RAMENOFSKY, M. (2013): Contributions of endocrinology to the migration life history of birds. In: *General and Comparative Endocrinology* 190, S. 47–60. DOI: 10.1016/j.ygcen.2013.03.027.

CORREA, S. M.; HORAN, C. M.; JOHNSON, P. A.; ADKINS-REGAN, E. (2011): Copulatory behaviors and body condition predict post-mating female hormone concentrations, fertilization success, and primary sex ratios in Japanese quail. In: *Hormones and Behavior* 59 (4), S. 556–564. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2011.02.009.

COTTER, P. F. (2015): An examination of the utility of heterophil-lymphocyte ratios in assessing stress of caged hens. In: *Poultry Science* 94 (3), S. 512–517. DOI: 10.3382/ps/peu009.

CRAY, C.; GAUTIER, D.; HARRIS, D. J.; ARHEART, K. L. (2008): Changes in clinical enzyme activity and bile acid levels in psittacine birds with altered liver function and disease. In: *Journal of Avian Medicine and Surgery* 22 (1), S. 17–24. DOI: 10.1647/2006-011R.1.

CREEL, S. (2001): Social dominance and stress hormones. In: *Trends in Ecology & Evolution* 16 (9), S. 491–497. DOI: 10.1016/S0169-5347(01)02227-3.

CROSSIN, G. T.; TRATHAN, P. N.; PHILLIPS, R. A.; GORMAN, K. B.; DAWSON, A.; SAKAMOTO, K. Q.; WILLIAMS, T. D. (2012): Corticosterone predicts foraging behavior and parental care in Macaroni penguins. In: *The American Naturalist* 180 (1), E31-41. DOI: 10.1086/666001.

DAVIS, A. K.; MANEY, D. L.; MAERZ, J. C. (2008): The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. In: *Functional Ecology* 22 (5), S. 760–772. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x.

DE JONG, I. C.; VAN VOORST, A. S.; ERKENS, J. H.; EHLHARDT, D. A.; BLOKHUIS, H. J. (2001): Determination of the circadian rhythm in plasma corticosterone and catecholamine concentrations in growing broiler breeders using intravenous cannulation. In: *Physiology & Behavior* 74 (3), S. 299–304. DOI: 10.1016/s0031-9384(01)00562-5.

DE KORT, S. R.; ELDERMIRE, E. R. B.; CRAMER, E. R. A.; VEHRENCAMP, S. L. (2009): The deterrent effect of bird song in territory defense. In: *Behavioral Ecology: official journal of the International Society for Behavioral Ecology* 20 (1), S. 200–206. DOI: 10.1093/beheco/arn135.

DERKHO, M. A.; SAJFUTDINOVA, L. N.; STRIZHIKOV, V. K.; STRIZHIKOVA, S. V.; PONOMARYOVA, T. A. (2021): The role of corticosterone in the regulation of the cellular composition of chicken blood during the stress reaction. In: *E3S Web of Conferences* 282: 03003. DOI: 10.1051/e3sconf/202128203003.

DEVICHE, P.; BREUNER, C.; ORCHINIK, M. (2001): Testosterone, corticosterone, and photoperiod interact to regulate plasma levels of binding globulin and free steroid hormone in dark-eyed juncos, *Junco hyemalis*. In: *General and Comparative Endocrinology* 122 (1), S. 67–77. DOI: 10.1006/gcen.2001.7613.

DEVICHE, P.; BITTNER, S.; GAO, S.; VALLE, S. (2017): Roles and Mechanistic Bases of Glucocorticoid Regulation of Avian Reproduction. In: *Integrative and Comparative Biology* 57 (6), S. 1184–1193. DOI: 10.1093/icb/icx112.

DEVICHE, P. J.; GAO, S.; DAVIES, S.; SHARP, P. J.; DAWSON, A. (2012): Rapid stress-induced inhibition of plasma testosterone in free-ranging male rufous-winged sparrows, *Peucaea carpalis*: characterization, time course, and recovery. In: *General and Comparative Endocrinology* 177 (1), S. 1–8. DOI: 10.1016/j.ygcen.2012.02.022.

DEVICHE, P. J.; HURLEY, L. L.; FOKIDIS, H. B.; LERBOUR, B.; SILVERIN, BE.; SILVERIN, BJ.; SABO, J.; SHARP, P. J. (2010): Acute stress rapidly decreases plasma testosterone in a free-ranging male songbird: potential site of action and mechanism. In: *General and Comparative Endocrinology* 169 (1), S. 82–90. DOI: 10.1016/j.ygcen.2010.07.009.

DICKENS, M. J.; BALTHAZART, J.; CORNIL, C. A. (2012): Brain aromatase and circulating corticosterone are rapidly regulated by combined acute stress and sexual interaction in a sex-specific manner. In: *Journal of Neuroendocrinology* 24 (10), S. 1322–1334. DOI: 10.1111/j.1365-2826.2012.02340.x.

DONG, H.; LIN, H.; JIAO, H. C.; SONG, Z. G.; ZHAO, J. P.; JIANG, K. J. (2007): Altered development and protein metabolism in skeletal muscles of broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*) by corticosterone. In: *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 147 (1), S. 189–195. DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.12.034.

EIKENAAR, C.; MÜLLER, F.; LEUTGEB, C.; HESSLER, S.; LEBUS, K.; TAYLOR, P. D.; SCHMALJOHANN, H. (2017): Corticosterone and timing of migratory departure in a songbird. In: *Proceedings. Biological Sciences* 284 (1846): 20162300. DOI: 10.1098/rspb.2016.2300.

ELFWING, M.; NÄTT, D.; GOERLICH-JANSSON, V. C.; PERSSON, M.; HJELM, J.; JENSEN, P. (2015): Early stress causes sex-specific, life-long changes in behaviour, levels of gonadal hormones, and gene expression in chickens. In: *PLoS ONE* 10 (5): e0125808. DOI: 10.1371/journal.pone.0125808.

EL-LETHEY, H.; AERNI, V.; JUNGI, T. W.; WECHSLER, B. (2000): Stress and feather pecking in laying hens in relation to housing conditions. In: *British Poultry Science* 41 (1), S. 22–28. DOI: 10.1080/00071660086358.

ENGELAND, W. C.; ARNHOLD, M. M. (2005): Neural circuitry in the regulation of adrenal corticosterone rhythmicity. In: *Endocrine* 28 (3), S. 325–332. DOI: 10.1385/ENDO:28:3:325.

ERIKSEN, M. S.; HAUG, A.; TORJESEN, P. A.; BAKKEN, M. (2003): Prenatal exposure to corticosterone impairs embryonic development and increases fluctuating asymmetry in chickens (*Gallus gallus domesticus*). In: *British Poultry Science* 44 (5), S. 690–697. DOI: 10.1080/00071660310001643660.

ETCHES, R. J. (1979): Plasma concentrations of progesterone and corticosterone during the ovulation cycle of the hen (*Gallus domesticus*). In: *Poultry Science* 58 (1), S. 211–216. DOI: 10.3382/ps.0580211.

EVANS, C. S.; EVANS, L. (2007): Representational signalling in birds. In: *Biology Letters* 3 (1), S. 8–11. DOI: 10.1098/rsbl.2006.0561.

FALLAHSHAROUDI, A.; DE KOCK, N.; JOHNSON, M.; UBHAYASEKERA, S. J. K. A.; BERGQUIST, J.; WRIGHT, D.; JENSEN, P. (2015): Domestication effects on stress induced steroid secretion and adrenal gene expression in chickens. In: *Scientific Reports* 5: 15345. DOI: 10.1038/srep15345.

FERNANDES, P. A.; TAMURA, E. K.; D'ARGENIO-GARCIA, L.; MUXEL, S. M.; DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.; MARÇOLA, M.; CARVALHO-SOUSA, C. E.; CECON, E.; FERREIRA, Z. S.; MARKUS, R. P. (2017): Dual Effect of Catecholamines and Corticosterone Crosstalk on Pineal Gland Melatonin Synthesis. In: *Neuroendocrinology* 104 (2), S. 126–134. DOI: 10.1159/000445189.

FOUDA, M. M.; DARWISH, R. A.; ABOU-ISMAIL, U.; SAAD, A. (2018): Comparative effects of natural and artificial light on behaviour, performance and welfare of broiler chickens. In: *Mansoura Veterinary Medical Journal* 19 (1), S. 321-333. Online verfügbar unter https://www.researchgate.net/publication/353665534_Comparative_effects_of_natural_and_artificial_light_on_behaviour_performance_and_welfare_of_broiler_chickens (Stand 24.03.2024)

FUMIHITO, A.; MIYAKE, T.; SUMI, S.; TAKADA, M.; OHNO, S.; KONDO, N. (1994): One subspecies of the red junglefowl (*Gallus gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (26), S. 12505–12509. DOI: 10.1073/pnas.91.26.12505.

FUNDER, J. W. (2005): Mineralocorticoid receptors: distribution and activation. In: *Heart Failure Reviews* 10 (1), S. 15–22. DOI: 10.1007/s10741-005-2344-2.

GOMES, A. V. S.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; RIBEIRO, A.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M. L.; BASKEVILLE, E.; AKAMINE, A. T.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; FERREIRA, A. J. P.; PALERMONETO, J. (2014): Overcrowding stress decreases macrophage activity and increases *Salmonella* Enteritidis invasion in broiler chickens. In: *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A* 43 (1), S. 82–90. DOI: 10.1080/03079457.2013.874006.

- GOULD, N. R.; SIEGEL, H. S. (1978): Partial Purification and Characterization of Chicken Corticosteroid-Binding Globulin 1. In: *Poultry Science* 57 (6), S. 1733–1739. DOI: 10.3382/ps.0571733.
- GOUTTE, A.; ANGELIER, F.; CHASTEL, C. C.; TROUVÉ, C.; MOE, B.; BECH, C.; GABRIELSEN, G. W.; CHASTEL, O. (2010): Stress and the timing of breeding: glucocorticoid-luteinizing hormones relationships in an arctic seabird. In: *General and Comparative Endocrinology* 169 (1), S. 108–116. DOI: 10.1016/j.ygcen.2010.07.016.
- GOYMANN, W. (2012): On the use of non-invasive hormone research in uncontrolled, natural environments: the problem with sex, diet, metabolic rate and the individual. In: *Methods in Ecology and Evolution* 3, S. 757–765. DOI: 10.1111/j.2041-210X.2012.00203.x.
- GOYMANN, W.; GEUE, D.; SCHWABL, I.; FLINKS, H.; SCHMIDL, D.; SCHWABL, H.; GWINNER, E. (2006): Testosterone and corticosterone during the breeding cycle of equatorial and European stonechats (*Saxicola torquata axillaris* and *S. t. rubicola*). In: *Hormones and Behavior* 50 (5), S. 779–785. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2006.07.002.
- GROOTHUIS, T. G. G.; MÜLLER, W.; VON ENGELHARDT, N.; CARERE, C.; EISING, C. (2005): Maternal hormones as a tool to adjust offspring phenotype in avian species. In: *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29 (2), S. 329–352. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2004.12.002.
- GWINNER, E.; BRANDSTÄTTER, R. (2001): Complex bird clocks. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 356 (1415), S. 1801–1810. DOI: 10.1098/rstb.2001.0959.

HÄFFELIN, K. E.; KAUFMANN, F.; LINDENWALD, R.; DÖHRING, S.; SPINDLER, B.; PREISINGER, R.; RAUTENSCHLEIN, S.; Kemper, N.; ANDERSSON, R. (2021): Corticosterone in feathers: Inter- and intraindividual variation in pullets and the importance of the feather type. In: *Veterinary and Animal Science* 11: 100155. DOI: 10.1016/j.vas.2020.100155.

HARR, K. E.; RASKIN, R. E.; HEARD, D. J. (2005): Temporal effects of 3 commonly used anticoagulants on hematologic and biochemical variables in blood samples from macaws and Burmese pythons. In: *Veterinary Clinical Pathology* 34 (4), S. 383–388. DOI: 10.1111/j.1939-165x.2005.tb00065.x.

HAUSSMANN, M. F.; LONGENECKER, A. S.; MARCHETTO, N. M.; JULIANO, S. A.; BOWDEN, R. M. (2012): Embryonic exposure to corticosterone modifies the juvenile stress response, oxidative stress and telomere length. In: *Proceedings. Biological Sciences* 279 (1732), S. 1447–1456. DOI: 10.1098/rspb.2011.1913.

HAUSSMANN, M. F.; MARCHETTO, N. M. (2010): Telomeres: Linking stress and survival, ecology and evolution. In: *Current Zoology* 56 (6), S. 714–727. DOI: 10.1093/czoolo/56.6.714.

HEIBLUM, R.; ARNON, E.; CHAZAN, G.; ROBINZON, B.; GVARYAHU, G.; SNAPIR, N. (2001): Glucocorticoid administration during incubation: embryo mortality and posthatch growth in chickens. In: *Poultry Science* 80 (9), S. 1357–1363. DOI: 10.1093/ps/80.9.1357.

HEIBLUM, R.; ARNON, E.; GVARYAHU, G.; ROBINZON, B.; SNAPIR, N. (2000): Short-term stress increases testosterone secretion from testes in male domestic fowl. In: *General and Comparative Endocrinology* 120 (1), S. 55–66. DOI: 10.1006/gcen.2000.7538.

HERBORN, K. A.; GRAVES, J. L.; JEREM, P.; EVANS, N. P.; NAGER, R.; MCCAFFERTY, D. J.; MCKEEGAN, D. E. F. (2015): Skin temperature reveals the intensity of acute stress. In: *Physiology & Behavior* 152 (Pt A), S. 225–230. DOI: 10.1016/j.physbeh.2015.09.032.

HERBORN, K. A.; JEREM, P.; NAGER, R. G.; MCKEEGAN, D. E. F.; MCCAFFERTY, D. J. (2018): Surface temperature elevated by chronic and intermittent stress. In: *Physiology & Behavior* 191, S. 47–55. DOI: 10.1016/j.physbeh.2018.04.004.

HILLEBRECHT, T.; KORBEL, R.; RINDER, M.; GAHR, M. (2024): Circadian Corticosterone Profile in Laying Hens (*Gallus gallus domesticus*). In: *Animals: an open access journal from MDPI* 14 (6): 873. DOI: 10.3390/ani14060873.

HODGSON, Z. G.; MEDDLE, S. L.; ROBERTS, M. L.; BUCHANAN, K. L.; EVANS, M. R.; METZDORF, R.; GAHR, M.; HEALY, S. D. (2007): Spatial ability is impaired and hippocampal mineralocorticoid receptor mRNA expression reduced in zebra finches (*Taeniopygia guttata*) selected for acute high corticosterone response to stress. In: *Proceedings. Biological Sciences* 274 (1607), S. 239–245. DOI: 10.1098/rspb.2006.3704.

HU, Y.; SUN, Q.; HU, Y.; HOU, Z.; ZONG, Y.; OMER, N. A.; ABOBAKER, H.; ZHAO, R. (2018): Corticosterone-Induced Lipogenesis Activation and Lipophagy Inhibition in Chicken Liver Are Alleviated by Maternal Betaine Supplementation. In: *The Journal of Nutrition* 148 (3), S. 316–325. DOI: 10.1093/jn/nxx073.

HU, Y.; SUN, Q.; LIU, J.; JIA, Y.; CAI, D.; IDRIS, A. A.; OMER, N. A.; ZHAO, R. (2017): In ovo injection of betaine alleviates corticosterone-induced fatty liver in chickens through epigenetic modifications. In: *Scientific Reports* 7: 40251. DOI: 10.1038/srep40251.

JACOBSEN, K. R.; KALLIOKOSKI, O.; TEILMANN, A. C.; HAU, J.; ABELSON, K. S. P. (2012): The effect of isoflurane anaesthesia and vasectomy on circulating corticosterone and ACTH in BALB/c mice. In: *General and Comparative Endocrinology* 179 (3), S. 406–413. DOI: 10.1016/j.ygcen.2012.09.012.

JANCZAK, A. M.; BRAASTAD, B. O.; BAKKEN, M. (2006): Behavioural effects of embryonic exposure to corticosterone in chickens. In: *Applied Animal Behaviour Science* 96 (1-2), S. 69–82. DOI: 10.1016/j.applanim.2005.04.020.

JAVED, S.; RAHMANI, A. R. (2000): Flocking and habitat use pattern of the Red Junglefowl *Gallus gallus* in Dudwa National Park, India. In: *Tropical Ecology* 41 (1), S. 11-16. Online verfügbar unter https://www.researchgate.net/publication/237448530_Flocking_and_habitat_use_pattern_of_the_Red_Junglefowl_Gallus_gallus_in_Dudwa_National_Park_India (Stand 24.03.2024)

JIANG, R. S.; XU, G. Y.; ZHANG, X. Q.; YANG, N. (2005): Association of polymorphisms for prolactin and prolactin receptor genes with broody traits in chickens. In: *Poultry Science* 84 (6), S. 839–845. DOI: 10.1093/ps/84.6.839.

JOHNSON, A. L. (1981): Comparison of three serial blood sampling techniques on plasma hormone concentrations in the laying hen. In: *Poultry Science* 60 (10), S. 2322–2327. DOI: 10.3382/ps.0602322.

JOHNSON, A. L.; VAN TIENHOVEN, A. (1980): Plasma concentrations of six steroids and LH during the ovulatory cycle of the hen, *Gallus domesticus*. In: *Biology of Reproduction* 23 (2), S. 386–393. DOI: 10.1095/biolreprod23.2.386.

JOHNSON, A. L. (2015): Reproduction in the Female. In: Colin G. Scanes und Paul D. Sturkie (Hg.): *Sturkie's avian physiology*. 6. ed. Amsterdam: Elsevier, S. 635–665. eBook ISBN: 9780124072435.

JOSEPH, M. M.; MEIER, A. H. (1973): Daily rhythms of plasma corticosterone in the common pigeon, *Columba livia*. In: *General and Comparative Endocrinology* 20 (2), S. 326–330. DOI: 10.1016/0016-6480(73)90184-6.

JULIOUS, S. A. (2005): Sample size of 12 per group rule of thumb for a pilot study. In: *Pharmaceutical Statistics* 4 (4), S. 287–291. DOI: 10.1002/pst.185.

KALSBECK, A.; VAN DER SPEK, R.; LEI, J.; ENDERT, E.; BUIJS, R. M.; FLIERS, E. (2012): Circadian rhythms in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 349 (1), S. 20–29. DOI: 10.1016/j.mce.2011.06.042.

KEELING, L.; ANDERSSON, L.; SCHÜTZ, K. E.; KERJE, S.; FREDRIKSSON, R.; CARLBORG, O.; CORNWALLIS, C. K.; PIZZARI, T.; JENSEN, P. (2004): Chicken genomics: feather-pecking and victim pigmentation. In: *Nature* 431 (7009), S. 645–646. DOI: 10.1038/431645a.

KJAER, J. B.; VESTERGAARD, K. S. (1999): Development of feather pecking in relation to light intensity. In: *Applied Animal Behaviour Science* 62 (2-3), S. 243–254. DOI: 10.1016/S0168-1591(98)00217-2.

KO, M. J.; LIM, C.-Y. (2021): General considerations for sample size estimation in animal study. In: *Korean Journal of Anesthesiology* 74 (1), S. 23–29. DOI: 10.4097/kja.20662.

KOCH, K. A.; WINGFIELD, J. C.; BUNTIN, J. D. (2002): Glucocorticoids and parental hyperphagia in ring doves (*Streptopelia risoria*). In: *Hormones and Behavior* 41 (1), S. 9–21. DOI: 10.1006/hbeh.2001.1726.

KOKOLAKIS, A.; SMITH, C. L.; EVANS, C. S. (2010): Aerial alarm calling by male fowl (*Gallus gallus*) reveals subtle new mechanisms of risk management. In: *Animal Behaviour* 79 (6), S. 1373–1380. DOI: 10.1016/j.anbehav.2010.03.013.

KORBEL, R.; REESE, S.; LIEBICH, H.-G. (2012): Fixationstechniken und Anästhesieverfahren. In: Horst E. König, Rüdiger Korbel, Hans G. Liebich, Horst Erich König, Hans-Georg Liebich und Rüdiger T. Korbel (Hg.): *Anatomie der Vögel. Klinische Aspekte und Propädeutik. Zier-, Greif-, Zoo-, Wildvögel und Wirtschaftsgeflügel*. 2. Aufl. Stuttgart: Schattauer, S. 293–304. ISBN: 9783794564873.

KORTE, S. M.; BEUVING, G.; RUESINK, W.; BLOKHUIS, H. J. (1997): Plasma catecholamine and corticosterone levels during manual restraint in chicks from a high and low feather pecking line of laying hens. In: *Physiology & Behavior* 62 (3), S. 437–441. DOI: 10.1016/s0031-9384(97)00149-2.

LATTIN, C. R.; WALDRON-FRANCIS, K.; RICHARDSON, J. W.; DE BRUIJN, R.; BAUER, C. M.; BREUNER, C. W.; ROMERO, L. M. (2012): Pharmacological characterization of intracellular glucocorticoid receptors in nine tissues from house sparrow (*Passer domesticus*). In: *General and Comparative Endocrinology* 179 (2), S. 214–220. DOI: 10.1016/j.ygcen.2012.08.007.

LAY JR., D. C.; WILSON, M. E. (2002): Development of the chicken as a model for prenatal stress. In: *Journal of animal science* 80 (7), S. 1954–1961. DOI: 10.2527/2002.8071954x.

LEE, J.; NOH, B.; JANG, S.; PARK, D.; CHUNG, Y.; CHANG, H.-H. (2015): Stress detection and classification of laying hens by sound analysis. In: *Asian-Australasian journal of Animal Sciences* 28 (4), S. 592–598. DOI: 10.5713/ajas.14.0654.

LEONARD, B. E. (2006): HPA and immune axes in stress: involvement of the serotonergic system. In: *Neuroimmunomodulation* 13 (5-6), S. 268–276. DOI: 10.1159/000104854.

LIN, H.-Y.; SONG, G.; LEI, F.; LI, D.; QU, Y. (2021): Avian corticosteroid-binding globulin: biological function and regulatory mechanisms in physiological stress responses. In: *Frontiers in Zoology* 18 (1): 22. DOI: 10.1186/s12983-021-00409-w.

LOHMANN DEUTSCHLAND GMBH & CO. KG (2024): Lohmann Brown - Classic. Online verfügbar unter <https://lohmann-deutschland.de/legehennenrassen/konventionell/lohmann-brown-classic/> (Stand 24.03.2024)

LOVE, O. P.; CHIN, E. H.; WYNNE-EDWARDS, K. E.; WILLIAMS, T. D. (2005): Stress hormones: a link between maternal condition and sex-biased reproductive investment. In: *The American Naturalist* 166 (6), S. 751–766. DOI: 10.1086/497440.

LU, S.; WEI, F.; LI, G. (2021): The evolution of the concept of stress and the framework of the stress system. In: *Cell stress* 5 (6), S. 76–85. DOI: 10.15698/cst2021.06.250.

LUNDÉN, G.; GJØEN, J.; HEDLUND, L.; JENSEN, P.; OSCARSSON, R. (2022): Play ontogeny in young chickens is affected by domestication and early stress. In: *Scientific Reports* 12 (1): 13576. DOI: 10.1038/s41598-022-17617-x.

MADISON, F. N.; ROUSE JR., M. L.; BALTHAZART, J.; BALL, G. F. (2015): Reversing song behavior phenotype: Testosterone driven induction of singing and measures of song quality in adult male and female canaries (*Serinus canaria*). In: *General and Comparative Endocrinology* 215, S. 61–75. DOI: 10.1016/j.ygcen.2014.09.008.

MAO, A.; GIRAUDET, C. S. E.; LIU, K.; DE ALMEIDA NOLASCO, I.; XIE, ZHIQIN.; XIE, ZHIXUN; GAO, Y.; THEOBALD, J.; BHATTA, D.; STEWART, R.; MCELLIGOTT, A. G. (2022): Automated identification of chicken distress vocalizations using deep learning models. In: *Journal of the Royal Society, Interface* 19 (191): 20210921. DOI: 10.1098/rsif.2021.0921.

MATUR, E.; ERASLAN, E.; AKYAZI, I.; ERGUL EKIZ, E.; ESECELI, H.; KETEN, M.; METINER, K.; AKTARAN BALA, D. (2015): The effect of furnished cages on the immune response of laying hens under social stress. In: *Poultry Science* 94 (12), S. 2853–2862. DOI: 10.3382/ps/pev297.

NASIR, A.; MOUDGAL, R. P.; SINGH, N. B. (1999): Involvement of corticosterone in food intake, food passage time and in vivo uptake of nutrients in the chicken (*Gallus domesticus*). In: *British Poultry Science* 40 (4), S. 517–522. DOI: 10.1080/00071669987296.

NEETHIRAJAN, S. (2023): Vocalization Patterns in Laying Hens - An Analysis of Stress-Induced Audio Responses. Preprint. DOI: 10.1101/2023.12.26.573338. Online verfügbar unter <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.12.26.573338v1> (Stand 24.03.2024)

NEWMAN, A. E. M.; MACDOUGALL-SHACKLETON, S. A.; AN, Y.-S.; KRIENGWATANA, B.; SOMA, K. K. (2010): Corticosterone and dehydroepiandrosterone have opposing effects on adult neuroplasticity in the avian song control system. In: *The Journal of Comparative Neurology* 518 (18), S. 3662–3678. DOI: 10.1002/cne.22395.

OTSUKA, T.; GOTO, M.; KAWAI, M.; TOGO, Y.; SATO, K.; KATOH, K.; FURUSE, M.; YASUO, S. (2012): Photoperiod regulates corticosterone rhythms by altered adrenal sensitivity via melatonin-independent mechanisms in Fischer 344 rats and C57BL/6J mice. In: *PLoS ONE* 7 (6): e39090. DOI: 10.1371/journal.pone.0039090.

OUYANG, J. Q.; SHARP, P. J.; DAWSON, A.; QUETTING, M.; HAU, M. (2011): Hormone levels predict individual differences in reproductive success in a passerine bird. In: *Proceedings. Biological Sciences* 278 (1717), S. 2537–2545. DOI: 10.1098/rspb.2010.2490.

OWEN, D. J.; LANE, J. M. (2006): High levels of corticosterone in feather-plucking parrots (*Psittacus erithacus*). In: *The Veterinary Record* 158 (23), S. 804–805. DOI: 10.1136/vr.158.23.804.

PERSAUD, K. N.; GALEF JR., B. G. (2005): Female Japanese quail (*Coturnix japonica*) mated with males that harassed them are unlikely to lay fertilized eggs. In: *Journal of Comparative Psychology (Washington, D.C.: 1983)* 119 (4), S. 440–446. DOI: 10.1037/0735-7036.119.4.440.

PROUDMAN, J. A. (1991): Daily rhythm of prolactin and corticosterone in unrestrained, incubating turkey hens. In: *Domestic Animal Endocrinology* 8 (2), S. 265–270. DOI: 10.1016/0739-7240(91)90062-o.

QUEIROZ, S. A.; CROMBERG, V. U. (2006): Aggressive behavior in the genus *Gallus* sp. In: *Revista Brasileira Ciencia Avicola* 8 (1). DOI: 10.1590/S1516-635X2006000100001.

RAIOLA, G.; DI TORE, P. A. (2012): Statistical study on bodily communication skills in volleyball to improve teaching methods. In: *Journal of Human Sport and Exercise* 7 (2), S. 468–488. DOI: 10.4100/jhse.2012.72.12.

RALPH, C. R.; HEMSWORTH, P. H.; LEURY, B. J.; TILBROOK, A. J. (2015): Relationship between plasma and tissue corticosterone in laying hens (*Gallus gallus domesticus*): implications for stress physiology and animal welfare. In: *Domestic Animal Endocrinology* 50, S. 72–82. DOI: 10.1016/j.domaniend.2014.09.002.

RASIKA, S.; NOTTEBOHM, F.; ALVAREZ-BUYLLA, A. (1994): Testosterone increases the recruitment and/or survival of new high vocal center neurons in adult female canaries. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (17), S. 7854–7858. DOI: 10.1073/pnas.91.17.7854.

REMAGE-HEALEY, L.; ROMERO, L. M. (2000): Daily and seasonal variation in response to stress in captive starlings (*Sturnus vulgaris*): glucose. In: *General and Comparative Endocrinology* 119 (1), S. 60–68. DOI: 10.1006/gcen.2000.7492.

RETTENBACHER, S.; MÖSTL, E.; GROOTHUIS, T. G. G. (2009): Gestagens and glucocorticoids in chicken eggs. In: *General and Comparative Endocrinology* 164 (2-3), S. 125–129. DOI: 10.1016/j.ygcen.2009.05.019.

REUL, J. M.; DE KLOET, E. R. (1985): Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. In: *Endocrinology* 117 (6), S. 2505–2511. DOI: 10.1210/endo-117-6-2505.

RICH, E. L.; ROMERO, L. M. (2001): Daily and photoperiod variations of basal and stress-induced corticosterone concentrations in house sparrows (*Passer domesticus*). In: *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 171 (7), S. 543–547. DOI: 10.1007/s003600100204.

RICH, E. L.; ROMERO, L. M. (2005): Exposure to chronic stress downregulates corticosterone responses to acute stressors. In: *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 288 (6): R1628-36. DOI: 10.1152/ajpregu.00484.2004.

ROMERO, L. M.; REMAGE-HEALEY, L. (2000): Daily and seasonal variation in response to stress in captive starlings (*Sturnus vulgaris*): corticosterone. In: *General and Comparative Endocrinology* 119 (1), S. 52–59. DOI: 10.1006/gcen.2000.7491.

RÖNQUIST-NII, Y.; EDLUND, P. O. (2005): Determination of corticosteroids in tissue samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37 (2), S. 341–350. DOI: 10.1016/j.jpba.2004.10.044.

SAINO, N.; ROMANO, M.; FERRARI, R. P.; MARTINELLI, R.; MØLLER, A. P. (2005): Stressed mothers lay eggs with high corticosterone levels which produce low-quality offspring. In: *The Journal of Experimental Zoology. Part A, Comparative Experimental Biology* 303 (11), S. 998–1006. DOI: 10.1002/jez.a.224.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. (2000): How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. In: *Endocrine Reviews* 21 (1), S. 55–89. DOI: 10.1210/edrv.21.1.0389.

SCANES, C. G. (2015): Blood. Chapter 10. In: Colin G. Scanes und Paul D. Sturkie (Hg.): *Sturkie's avian physiology*. 6. ed. Amsterdam: Elsevier, S. 167–191. eBook ISBN: 9780124072435.

SCANES, C. G. (2016): Biology of stress in poultry with emphasis on glucocorticoids and the heterophil to lymphocyte ratio. In: *Poultry Science* 95 (9), S. 2208–2215. DOI: 10.3382/ps/pew137.

SCHMIDT, K. L.; SOMA, K. K. (2008): Cortisol and corticosterone in the songbird immune and nervous systems: local vs. systemic levels during development. In: *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 295 (1): R103-10. DOI: 10.1152/ajpregu.00002.2008.

SCHWABL, P.; BONACCORSO, E.; GOYMANN, W. (2016): Diurnal variation in corticosterone release among wild tropical forest birds. In: *Frontiers in Zoology* 13 (19). DOI: 10.1186/s12983-016-0151-3.

SELYE, H. (1976): Stress without Distress. In: George Serban (Hg.): *Psychopathology of Human Adaptation*. Boston, MA, s.l.: Springer US, S. 137–146. ISBN-13: 978-0306309175.

SHARP, P. J.; DAWSON, A.; LEA, R. W. (1998): Control of luteinizing hormone and prolactin secretion in birds. In: *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 119 (3), S. 275–282. DOI: 10.1016/s0742-8413(98)00016-4.

SHI, H.; LI, B.; TONG, Q.; ZHENG, W.; ZENG, D.; FENG, G. (2019): Effects of LED Light Color and Intensity on Feather Pecking and Fear Responses of Layer Breeders in Natural Mating Colony Cages. In: *Animals: an open access journal from MDPI* 9 (10): 814. DOI: 10.3390/ani9100814.

SILVER, R.; REBOULLEAU, C.; LEHRMAN, D. S.; FEDER, H. H. (1974): Radioimmunoassay of plasma progesterone during the reproductive cycle of male and female ring doves (*Streptopelia risoria*). In: *Endocrinology* 94 (6), S. 1547–1554. DOI: 10.1210/endo-94-6-1547.

SMITH, G. T.; BRENOWITZ, E. A.; BEECHER, M. D.; WINGFIELD, J. C. (1997): Seasonal changes in testosterone, neural attributes of song control nuclei, and song structure in wild songbirds. In: *Journal of Neuroscience* 17 (15), S. 6001–6010. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.17-15-06001.1997.

SOBOTIK, E. B.; NELSON, J. R.; ARCHER, G. S. (2020): How does ultraviolet light affect layer production, fear, and stress. In: *Applied Animal Behaviour Science* 223 (5): 104926. DOI: 10.1016/j.applanim.2019.104926.

SOCKMAN, K. W.; SCHWABL, H. (1999): Daily estradiol and progesterone levels relative to laying and onset of incubation in canaries. In: *General and Comparative Endocrinology* 114 (2), S. 257–268. DOI: 10.1006/gcen.1999.7252.

SOLEIMANI, A. F.; ZULKIFLI, I.; OMAR, A. R.; RAHA, A. R. (2011): Neonatal feed restriction modulates circulating levels of corticosterone and expression of glucocorticoid receptor and heat shock protein 70 in aged Japanese quail exposed to acute heat stress. In: *Poultry Science* 90 (7), S. 1427–1434. DOI: 10.3382/ps.2011-01403.

SUMMERS, C. H.; WINBERG, S. (2006): Interactions between the neural regulation of stress and aggression. In: *The Journal of Experimental Biology* 209 (Pt 23), S. 4581–4589. DOI: 10.1242/jeb.02565.

TAKAHASHI, T.; KAWASHIMA, M. (2008): Mesotocin increases the sensitivity of the hen oviduct uterus to arginine vasotocin. In: *Poultry Science* 87 (10), S. 2107–2111. DOI: 10.3382/ps.2008-00076.

TARLOW, E. M.; HAU, M.; ANDERSON, D. J.; WIKELSKI, M. (2003): Diel changes in plasma melatonin and corticosterone concentrations in tropical Nazca boobies (*Sula granti*) in relation to moon phase and age. In: *General and Comparative Endocrinology* 133 (3), S. 297–304. DOI: 10.1016/s0016-6480(03)00192-8.

TCHEKALAROVA, J.; STOYNOVA, T.; ILIEVA, K.; MITREVA, R.; ATANASOVA, M. (2018): Agomelatine treatment corrects symptoms of depression and anxiety by restoring the disrupted melatonin circadian rhythms of rats exposed to chronic constant light. In: *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 171. DOI: 10.1016/j.pbb.2018.05.016.

TEFERA, M. (2012): Acoustic Signals in Domestic Chicken (*Gallus gallus*): A Tool for Teaching Veterinary Ethology and Implication for language learning. In: *Ethiopian Veterinary Journal* 16 (2). DOI: 10.4314/evj.v16i2.7.

THIERRY, A.-M.; BRAJON, S.; MASSEMIN, S.; HANDRICH, Y.; CHASTEL, O.; RACLOT, T. (2013): Decreased prolactin levels reduce parental commitment, egg temperatures, and breeding success of incubating male Adélie penguins. In: *Hormones and Behavior* 64 (4), S. 737–747. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2013.06.003.

TRAMONTIN, A. D.; BRENOWITZ, E. A. (2000): Seasonal plasticity in the adult brain. In: *Trends in Neurosciences* 23 (6), S. 251–258. DOI: 10.1016/s0166-2236(00)01558-7.

TSIPOURA, N.; SCANES, C. G.; BURGER, J. (1999): Corticosterone and growth hormone levels in shorebirds during spring and fall migration stopover. In: *The Journal of Experimental Zoology* 284 (6), S. 645–651. DOI: 10.1002/(SICI)1097-010X(19991101)284:6<645::AID-JEZ6>3.0.CO;2-P.

ULMER, VERLAG EUGEN (Hg.) (2023): Geflügeljahrbuch 2024. Schwerpunkt: Krisenmanagement. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer. Online verfügbar unter <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:24-epflicht-3048488>. ISBN-13: 978-3-8186-2090-5

UNDERWOOD, H.; STEELE, C. T.; ZIVKOVIC, B. (2001): Circadian organization and the role of the pineal in birds. In: *Microscopy Research and Technique* 53 (1), S. 48–62. DOI: 10.1002/jemt.1068.

VANDENBORNE, K.; DE GROEF, B.; GEELISSEN, S. M. E.; KÜHN, E. R.; DARRAS, V. M.; VAN DER GEYTEN, S. (2005): Corticosterone-induced negative feedback mechanisms within the hypothalamo-pituitary-adrenal axis of the chicken. In: *The Journal of Endocrinology* 185 (3), S. 383–391. DOI: 10.1677/joe.1.05969.

VASHCHENKO, G.; DAS, S.; MOON, K.-M.; ROGALSKI, J. C.; TAVES, M. D.; SOMA, K. K.; VAN PETEGEM, F.; FOSTER, L. J.; HAMMOND, G. L. (2016): Identification of Avian Corticosteroid-binding Globulin (SerpinA6) Reveals the Molecular Basis of Evolutionary Adaptations in SerpinA6 Structure and Function as a Steroid-binding Protein. In: *The Journal of Biological Chemistry* 291 (21), S. 11300–11312. DOI: 10.1074/jbc.M116.714378.

VILJOEN, F. P.; DU PREEZ, J. L.; WESSELS, J. C.; AUCAMP, M. E.; MEYER, L. C. R.; POHLIN, F. (2019): An HPLC-DAD validated method for the detection and quantification of cortisol, corticosterone and melatonin in plasma samples of two different animal species. In: *Die Pharmazie* 74 (4), S. 206–211. DOI: 10.1691/ph.2019.8225.

VON EUGEN, K.; NORDQUIST, R. E.; ZEINSTRA, E.; VAN DER STAAY, F. J. (2019): Stocking Density Affects Stress and Anxious Behavior in the Laying Hen Chick During Rearing. In: *Animals: an open access journal from MDPI* 9 (2): 53. DOI: 10.3390/ani9020053.

WADA, H.; BREUNER, C. W. (2010): Developmental changes in neural corticosteroid receptor binding capacity in altricial nestlings. In: *Developmental Neurobiology* 70 (13), S. 853–861. DOI: 10.1002/dneu.20819.

WADA, H.; SALVANTE, K. G.; WAGNER, E.; WILLIAMS, T. D.; BREUNER, C. W. (2009): Ontogeny and individual variation in the adrenocortical response of zebra finch (*Taeniopygia guttata*) nestlings. In: *Physiological and Biochemical Zoology: PBZ* 82 (4), S. 325–331. DOI: 10.1086/599320.

WEBB, M. L.; MASHALY, M. M. (1984): Effect of adaptation to handling on the circulating corticosterone concentration of laying hens. In: *British Poultry Science* 25 (3), S. 425–427. DOI: 10.1080/00071668408454883.

WEIMER, S. L.; WIDEMAN, R. F.; SCANES, C. G.; MAUROMOUSTAKOS, A.; CHRISTENSEN, K. D.; VIZZIER-THAXTON, Y. (2018): An evaluation of methods for measuring stress in broiler chickens. In: *Poultry Science* 97 (10), S. 3381–3389. DOI: 10.3382/ps/pey204.

WINGFIELD, J. C.; MATT, K. S.; FARNER, D. S. (1984): Physiologic properties of steroid hormone-binding proteins in avian blood. In: *General and Comparative Endocrinology* 53 (2), S. 281–292. DOI: 10.1016/0016-6480(84)90254-5.

WINGFIELD, J. C.; SMITH, J. P.; FARNER, D. S. (1982): Endocrine Responses of White-Crowned Sparrows to Environmental Stress. In: *The Condor* 84 (4), S. 399-409. DOI: 10.2307/1367443.

WISSMAN, A. M.; BRENOWITZ, E. A. (2009): The role of neurotrophins in the seasonal-like growth of the avian song control system. In: *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 29 (20), S. 6461–6471. DOI: 10.1523/jneurosci.0638-09.2009.

YAN, L.; YU, J.; CHEN, Z.; CHEN, R.; ZHU, H.; YAN, J.; SHI, Z. (2019): Glucocorticoid receptor involvement in goose (*Anas cygnoides*) pituitary somatotroph differentiation induced by glucocorticoids during embryonic development. In: *British Poultry Science* 60 (4), S. 395–403. DOI: 10.1080/00071668.2019.1621988.

YANG, Y.; CONG, W.; LIU, J.; ZHAO, M.; XU, P.; HAN, W.; WANG, D.; ZHAO, R. (2022a): Constant light in early life induces fear-related behavior in chickens with suppressed melatonin secretion and disrupted hippocampal expression of clock- and BDNF-associated genes. In: *Journal of Animal Science and Biotechnology* 13 (1): 67. DOI: 10.1186/s40104-022-00720-4.

YANG, Y.; HAN, W.; ZHANG, A.; ZHAO, M.; CONG, W.; JIA, Y.; WANG, D.; ZHAO, R. (2022b): Chronic corticosterone disrupts the circadian rhythm of CRH expression and m6A RNA methylation in the chicken hypothalamus. In: *Journal of Animal Science and Biotechnology* 13 (1): 29. DOI: 10.1186/s40104-022-00677-4.

YUAN, L.; LIN, H.; JIANG, K. J.; JIAO, H. C.; SONG, Z. G. (2008): Corticosterone administration and high-energy feed results in enhanced fat accumulation and insulin resistance in broiler chickens. In: *British Poultry Science* 49 (4), S. 487–495. DOI: 10.1080/00071660802251731.

ZAYTSOFF, S. J. M.; BROWN, C. L. J.; MONTINA, T.; METZ, G. A. S.; ABBOTT, D. W.; UWIERA, R. R. E.; INGLIS, G. D. (2019): Corticosterone-mediated physiological stress modulates hepatic lipid metabolism, metabolite profiles, and systemic responses in chickens. In: *Scientific Reports* 9 (1): 19225. DOI: 10.1038/s41598-019-52267-6.

ZEMAN, M.; HERICHOVÁ, I. (2011): Circadian melatonin production develops faster in birds than in mammals. In: *General and Comparative Endocrinology* 172 (1), S. 23–30. DOI: 10.1016/j.ygcen.2010.12.022.

ZIMMERMAN, P. H.; KOENE, P.; VAN HOOFF, J. A. (2000): Thwarting of behaviour in different contexts and the gavel-call in the laying hen. In: *Applied Animal Behaviour Science* 69 (4), S. 255–264. DOI: 10.1016/s0168-1591(00)00137-4.

XII. Anhang:

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1. Voliere der Versuchstiere mit Enrichment.....	51
Abbildung 2. Versuchstiere (Lohmann Brown Legehennen) in der Voliere.....	52
Abbildung 3. Lohmann Brown Legehenne mit Omlet Ltd. Warnweste für Hühner.....	54
Abbildung 4. Miniatur-Mikrofon, Eigenbau des Max-Planck-Instituts für Biologische Intelligenz, in Gründung, Seewiesen.....	56
Abbildung 5. Größenvergleich des Miniatur-Mikrofons mit einer 1 Cent-Münze.....	57
Abbildung 6. Technik-Setup in Voliere: Yagi-Antenne, Überwachungskamera und zusätzliches Mikrofon an der Wand.....	58
Abbildung 7. Technik-Setup vor der Voliere: Receiver, Audio/MIDI Interface und Oszilloskop sowie Bildschirm zur Aufzeichnung der Tonspuren.....	59
Abbildung 8. Verlaufsprofil CORT-Konzentrationen (pg/ml) aller Legehennen über 3 Tage, Blutprobennahme alle 4 Stunden (1, 7, 13 = 12:00; 2, 8, 14 = 16:00; 3, 9, 15 = 20:00; 4, 10, 16 = 00:00; 5, 11, 17 = 04:00; 6, 12, 18 = 08:00), exklusive Ausreißer von Henne Nr. 2 (37.068 pg/ml) (n = 215).....	69

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1. Plasma-CORT-Konzentrationen (pg/ml) aller Legehennen.....	71
---	----

XIII. Danksagung:

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rüdiger Korbel, der es mir ermöglichte meine Dissertation an der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische der LMU München durchzuführen und Teil eines Kooperationsprojekts mit dem Max-Planck-Institut für Biologische Intelligenz (in Gründung) zu werden. Ich möchte mich herzlich für das mir entgegengebrachte Vertrauen in meine Arbeit, für die fachliche Unterstützung und für eine stets hervorragende Betreuung bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Manfred Gahr möchte ich mich für eine interessante und lehrreiche Zeit am Max-Planck-Institut für Biologische Intelligenz (in Gründung) bedanken, in welcher ich Einblicke und erste Erfahrungen im Bereich der Forschung sammeln durfte. Auch ihm danke ich für die jederzeit sehr gute Co-Betreuung meiner Dissertation und für stets hilfreiche Impulse zur Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen.

Ein großer Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Monika Rinder für die zahlreichen Korrekturrunden bei der Erstellung meiner ersten Publikation und dass sie mich bei allen Fragestellungen rund um die Dissertation jederzeit unterstützte.

Für eine sehr fesselnde und lustige Zeit im Labor und in der Werkstatt möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bei Frau Monika Trappschuh, Herrn Prof. Dr. Wolfgang Goymann und Herrn Reinhard Biller vom Max-Planck-Institut für Biologische Intelligenz bedanken. Vielen Dank, dass ich den ganzen Weg meiner Proben vom Entnehmen bis zur Hormonbestimmung im Labor sowie die technischen Entwicklungen in der Werkstatt miterleben durfte.

Für eine große Hilfe bei dem Einstieg in die Statistik, ohne die ich es nicht geschafft hätte, sowie für die Möglichkeit, jederzeit Fragen stellen zu dürfen, möchte ich Herrn Yury Zablotski einen großen Dank aussprechen.

Meinen Kollegen und Freunden danke ich für die kleinen Aufmunterungen zwischendurch, die Unterstützung bei Lösungsfindungen im Rahmen der Durchführung der Doktorarbeit sowie für eine tolle Zeit in der Klinik, die ich nie vergessen werde.

Meinen Eltern danke ich von Herzen für die jederzeit bedingungslose Unterstützung zur Erreichung meiner Ziele und Träume und dafür, dass sie jederzeit ein offenes Ohr und gute Ratschläge für mich hatten.

Und ein besonders großes Dankeschön gilt meinem Freund, der täglich mit mir durch dick und dünn ging und mich mit Humor und Liebe bis zum Ende der Arbeit unterstützte. Danke, dass du mich in jeder Lage aufgeheitert hast.

