



Methoden voor de bepaling van corticosteron

in veren en cortisol in haren als mogelijke lange-termijn indicator voor dierenwelzijn

Elly C. Zeinstra¹, Lorenz Oeben², F. Josef van der Staay¹ en Rebecca E. Nordquist¹

¹Emotie & Cognitie Groep, Gezondheidszorg Landbouwhuisdieren, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht, ²Hogeschool Utrecht, ILC-stagiair
Contactpersoon: Elly Zeinstra, e.c.zeinstra@uu.nl, 030 2537213

In de huidige maatschappij speelt het welzijn van gezelschapsdieren, landbouwhuisdieren en dieren in dierentuinen en het wild een zeer belangrijke rol. De tegenwoordige dierhouders/ beheerders zijn zich meer en meer bewust van het welzijn van de dieren waarvoor men verantwoordelijk is. Waar men bij kleine huisdieren al langer het belang van welzijn voor ogen heeft (er is geen economisch belang dat zwaarder weegt), worden ook bij grote huisdieren (landbouwhuisdieren) zaken zoals huisvesting, medicijn gebruik en 'vrijheid' van bewegen belangrijker. Voor beide groepen geldt: het dier wordt meer en meer als een individu gezien, met het vermogen om te reageren op huisvesting en behandeling door de eigenaar. Dat het dier stress kan en zal ervaren, wordt ook steeds duidelijker. Aan ons de taak om een en ander zichtbaar te maken.

In het kader van dierenwelzijnsonderzoek is er gezocht naar een methode om welzijn in kaart te brengen waarbij dieren zo min mogelijk belast worden. Een maat voor welzijn (in feite van aangetast welzijn) is het gehalte van een van de belangrijkste glucocorticoïden, namelijk corticosteron (vogels) of cortisol (zoogdieren) (1). Dit kan in bloed, speeksel, faeces, veren of haar gemeten worden. Voor het meten van acute stress wordt bloed en speeksel gebruikt, voor meting over iets langere termijn wordt gebruik gemaakt van faeces, voor het meten van effecten van chronische stress worden veren of haren en de daarin opgeslagen corticosteron respectievelijk cortisol gebruikt. Voor de bepaling van glucocorticoïden zijn we uitgegaan van de methodes van Davenport *et al.* (2), Bortolotti *et al.* (3) en Berkvens (4). Deze gebruiken we in aangepaste vorm voor de bepaling van het gehalte aan corticosteron (veer) en cortisol (haar). Voor beide bepalingen wordt een min of meer vergelijkbaar protocol gebruikt.

Bepaling van corticosteron in veren

Voor de corticosteron bepaling bij vogels, in ons onderzoek bij de kip, worden de primaire slagpennen (3 en 8, zie afb. 1A) gebruikt. Plukken is echter een heel grote belasting: daarom hebben we gekozen voor plukken na euthanasie. Een andere methode zou zijn om de veren af te knippen »



**CONSTANCY
& TRACEABILITY**



SAFE

SCIENTIFIC ANIMAL FOOD & ENGINEERING

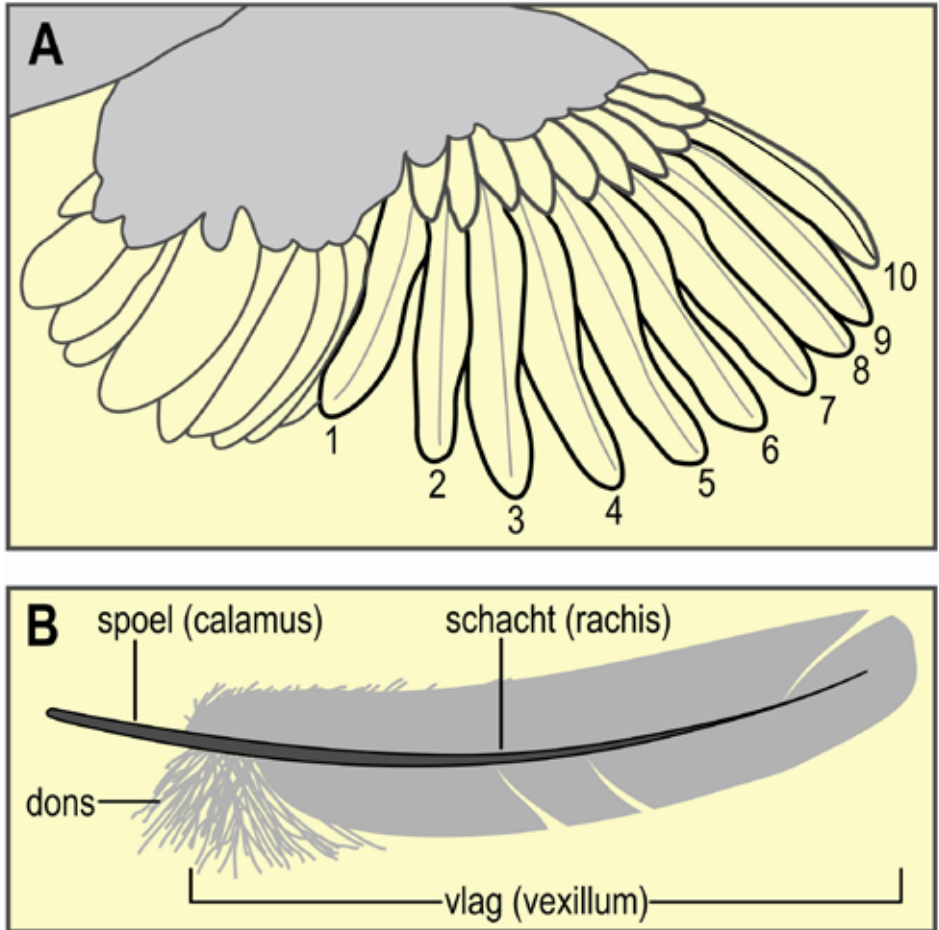


CONTROL



**DEDICATED
PLANT**





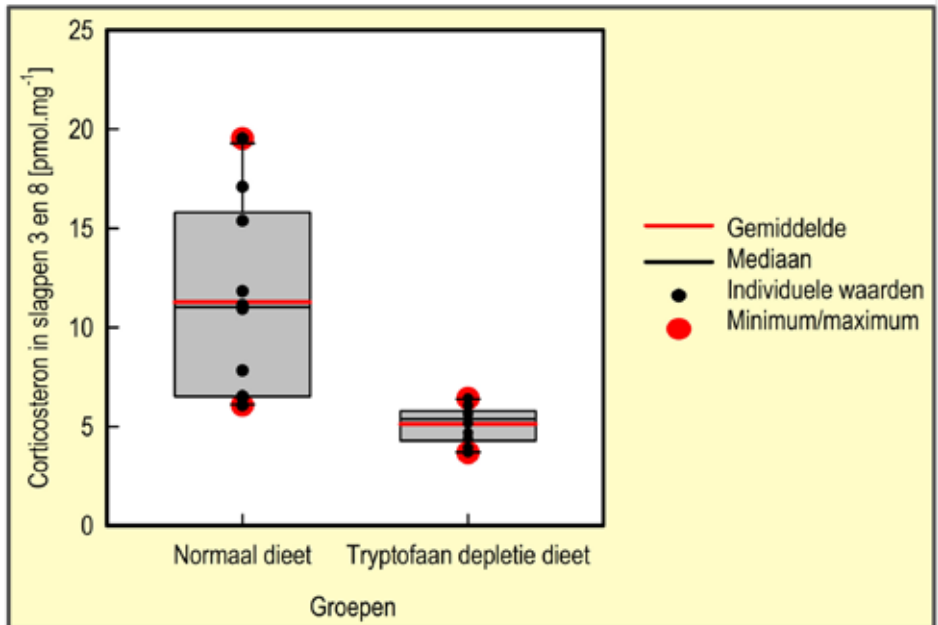
Afbeelding 1. Anatomie van de vleugel (A) en van een veer (B) van de kip. Veer 1 t/m 10 in afb. 1A zijn de hoofdslagpennen of primaire pennen. Wij hebben corticosteron in pen 3 en 8 bepaald.

bij levende kippen of na euthanasie. Beide methodes gaan uit van een bekende hoeveelheid veer. De veren worden in zakjes, in het donker bij kamertemperatuur bewaard.

Het opwerken van de veren: De lengte van de veren wordt genoteerd. Het wassen van de veren gebeurt door middel van sprayen met methanol waarna ze gedurende 1 minuut drogen in de zuurkast. Hierbij gebruiken we een vel papier waar de veer met de calamus (zie afb. 1B) op vastgeplakt wordt. De *calamus* (spoel), *rachis* (schacht) en eventueel de kleine donsveertjes bij de *calamus* worden verwijderd. De *vexillum* (vlag) wordt in stukjes van maximaal 5 mm geknipt, gewogen en overgebracht in een 15 mL reageerbuis. Per buis wordt 5 mL + 1 mL/30 mg vlag 80% methanol toegevoegd. Na 30 minuten soniceren gaan de buizen overnachten bij kamertemperatuur op de rollerbank (methanol-extractie). Vervolgens, na centrifugeren, wordt 1,5 mL supernatant per Eppendorf vaatje overgebracht en ingedampd in de Speedvac (3 uur bij 45°C). Het extract wordt met buffer uit een ELISA kit opgelost en is nu geschikt om verder te verwerken met deze kit. Bepalingen worden in drievoud gedaan en afgelezen bij 405 nm.

Voorbeeld: Effecten van een tryptofaan-deficiënt dieet op corticosteron

Een van onze vraagstellingen was: heeft een tryptofaan depletie dieet op korte en lange termijn een effect op fysiologische veranderingen gerelateerd aan stress? Tryptofaan (TRP) is een »



Afbeelding 2. Box-plots van de corticosteron niveaus in primaire slagpennen no. 3 en 8 van 40 weken oude kippen. De controle groep (n=10) kreeg een normaal dieet, de experimentele groep (n=10) een tryptofaan depletie dieet.

essentieel aminozuur, nodig als grondstof voor serotonine. Door de vermindering van het tryptofaan gehalte, treedt een verminderde serotonine productie op. De invloed van serotonine (5HT) op de hypothalamus-hypofyse-bijnier-as (HPA-as) is een complex proces, 5HT heeft een direct effect op de HPA-as en omgekeerd kan stress en een verhoogde HPA-as activiteit ook de 5HT-functie beïnvloeden. Uit een door Tanke *et al.* (5) aan ratten uitgevoerd onderzoek blijkt dat een verlaagd TRP dieet tot een verhoogde sensitiviteit (gevoeligheid) voor stressvolle stimuli leidde. Het adaptatievermogen (het vermogen tot aanpassing aan de stimulus) van deze ratten werd echter niet beïnvloedt.

Stress reactie en de HPA-as: door een acute stressprikkel wordt de hypothalamus aangezet tot productie van corticotropine-releasing hormoon (CRH), wat op zijn beurt de hypofyse (anterior) stimuleert tot het vrijmaken van het adrenocorticotroop hormoon (ACTH), waardoor de bijnierschors gestimuleerd wordt tot secretie van glucocorticoiden zoals corticosteron. Onder normale omstandigheden vindt deze uitscheiding twee tot drie keer per uur plaats. Onder invloed van stress wordt de uitscheiding van glucocorticoiden verhoogd, waardoor de negatieve terugkoppeling richting hypothalamus en hypofyse voor een verlaging van CRH en ACTH zorgt. Het lichaam zal opnieuw in evenwicht (*homeostase*) komen, waarmee de invloed van de prikkel ongedaan is gemaakt. Dit is ook het geval bij een langdurige blootstelling aan stressfactoren (dieet), waarbij een verschoven evenwicht kan leiden tot een verandering van het corticosteron-gehalte.

Hypothese: Een tryptofaan deficiënt dieet leidt indirect tot een verandering van corticosteron. Twintig Brown Nick leghennen zijn verdeeld over een controle en een test groep van elk tien dieren. Gedurende vijftien weken (week 26 – 40) heeft de testgroep een 85% tryptofaan depletie dieet (TDD) gekregen, en de controle groep (ND) een standaard dieet met een normale concentratie tryptofaan. Na euthanasie zijn de primaire pennen 3 en 8 verzameld. De corticosteron bepaling in veren is met een commerciële ELISA kit gedaan, Cayman Chemicals, Ann Harbor, USA.

Opvallend is dat de concentratie corticosteron juist omgekeerd was aan de verwachting, we hebben een verlaagde concentratie in de veren van de TDD groep gemeten ($t_{18} = -4.01$ $p=0.0008$; zie afb. 2).

Discussie

Stress bepaling bij vogel en zoogdier met behulp van glucocorticoiden in respectievelijk veren en haar, staat nog aan het begin van de ontwikkeling. Er zijn diverse onderzoeken uitgevoerd waarbij gekeken is naar het effect van dieet (ons voorbeeld), geboortegewicht en huisvesting (6). Omdat zowel de genetische eigenschappen van het dier (kleur, inborst) als ook externe factoren zoals beschadiging van lichaamsbekleding meespelen, zal dit in de concentratie terug te vinden zijn. Inmiddels worden er grotere testen opgezet waarbij we een duidelijker beeld krijgen van de betekenis van cortisol/corticosteron als welzijnsindicator voor de grote huisdieren.

Steeds meer onderzoeksgroepen houden zich bezig met non-invasieve methoden voor het vaststellen van stress. Er zijn inmiddels diverse ontwikkelingen waarbij, gebruikmakend van het groeipatroon van veren gedurende een bekende periode, de opgeslagen hoeveelheid glucocorticoiden gemeten kan worden (7). Er blijven nog aardig wat vragen over (8), maar mogelijk kunnen we gezamenlijk tot een goede methode komen waarbij we het dier zo veel als mogelijk ongehinderd laten.

De resultaten van ons kleine onderzoek naar de effecten van een TDD waren onverwacht. Hiervoor zijn meerdere verklaringen mogelijk. Gedurende de groeifase van de veer is de doorbloeding prima en kan er corticosteron vanuit het bloed opgeslagen worden. In de rustfase trekt de bloedtoevoer zich terug en zal er geen verdere opslag in de veren plaatsvinden (9). Niet alle veren zullen in dezelfde fase verkeren, een aantal veren is volgroeid, andere niet. Het tekort aan tryptofaan heeft tot een verhoging van het corticosteron in het bloed geleid (niet gepubliceerd). Deze verhoging kan tot een groeivertraging van de veren leiden (7), waardoor geen verdere opslag in de veren zal plaatsvinden. Bij het normale dieet is geen sprake van groeivertraging, en mogelijk heeft dat geleid tot een hoger gehalte. De lage corticosteron waarden in de TDD en de zeer kleine spreiding passen goed bij deze verklaring.

Een andere mogelijkheid is het voorkomen van een verminderde productie van corticosteron na een lange periode van stress, het zogenaamde *hypocortisolism*. Onder invloed van een combinatie van een drietal symptomen (verhoogde stressgevoeligheid, pijn en vermoeidheid) kan een chronische belasting een verminderde respons van de HPA-as teweegbrengen en daarmee een verlaging van de cortisolspiegel geven (10). De HPA activiteit is afhankelijk van het individu, de hormonale spiegel en de tijdsduur van de stress veroorzakende periode. Het beschreven onderzoek heeft laten zien dat het mogelijk is om met deze methode een verschil aan te tonen tussen de controle groep en de TDD groep.

De afwijking ten opzichte van een basaal meting geeft de stressgevoeligheid aan. In ons voorbeeld wilden we onderzoeken of er een verschil tussen de groepen aan te tonen was. Zowel de groeivertraging als ook de aanpassing aan langdurige stress (het hypocortisolism) zullen in ons voorbeeld een rol gespeeld hebben. In het kader van het welzijnsonderzoek zal er veel meer naar dat deel van de veer of haar gekeken kunnen worden dat gegroeid is tijdens een puls aanbieding (8).

Bepaling van cortisol in haar

In bovenstaande hebben we ons met het bepalen van corticosteron in de veren van kippen bezig gehouden. Bij varkens wordt niet corticosteron, maar cortisol bepaald. Evenals corticosteron bij kippen wordt cortisol in de haren van varkens (en van andere zoogdieren) als indicator voor blootstelling aan stress over een langere tijdsduur gezien.

Uit ervaring blijkt dat ca. 250 mg haren nodig zijn. Er is zoveel als mogelijk geprobeerd om van elk dier haarmonsters van gelijke kleur te verzamelen. De haarkleur is vervolgens genoteerd. Het »

afscheren van de haren wordt zo dicht mogelijk bij de huid gedaan, let op dat er geen huidbeschadigingen optreden. De flank haren zijn hiervoor gekozen omdat deze haren over de seizoenen heen een stabiel beeld lijken te geven.

Het opwerken van de haren: Voordat de ‘high sensitivity salivary cortisol ELISA kit (Salimetrics)’ gebruikt wordt, zullen een aantal voorbereidingen nodig zijn. Gedurende dit proces zal alles zoveel als mogelijk in het donker uitgevoerd worden! Allereerst worden de haren gewassen (2 x isopropanol) en gedroogd in een stoof bij 37°C, waarna we met behulp van een TissueLyser de haren verpulveren. We wegen daartoe 35 mg haar af in een 2.0 mL Eppendorf vaatje, waar 3 beads van 3.2 mm doorsnede aan toe zijn gevoegd. Vervolgens voegen we 1.0 mL methanol toe, en incuberen de vaatjes bij kamertemperatuur onder voortdurende beweging gedurende 24 uur voor extraheren van de cortisol. Na centrifugeren wordt 0.6 mL van het supernatant overgebracht in een tweede vaatje, welke in een Speedvac gedurende ca. 3 uur bij 45°C ingedampt wordt. Het gedroogde extract wordt vervolgens opgelost in de bij de kit behorende buffer, ook nu weer 24 uur op de shaker bij kamertemperatuur. Na centrifugatie is het monster klaar om volgens de kit gebruikt te worden. De bepalingen worden in duplo uitgevoerd en afgelezen bij 450 nm.

Literatuur

1. Cook NJ (2012). *Review: minimally invasive sampling media and the measurement of corticosteroids as biomarkers of stress in animals*. Canadian Journal of Animal Science 92: 227–259.
2. Davenport MD, Tiefenbacher S, Lutz CK et al. (2006). *Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques*. General and Comparative Endocrinology 147: 255–261.
3. Bortolotti GR, Marchant TA, Blas J et al. (2008). *Corticosterone in feathers is a long-term, integrated measure of avian stress physiology*. Functional Ecology 22: 494–500.
4. Berkvens CN (2012). *Keratin glucocorticoid analysis by enzyme immunoassay in mammals, birds and reptiles* PhD thesis, Doctor of Veterinary Science in Pathobiology. Guelph, Ontario, Canada: University of Guelph.
5. Tanke MAC, Alserda E, Doornbos B et al. (2008) *Low tryptophan diet increases stress-sensitivity, but does not affect habituation in rats*. Neurochemistry International 52: 272–281.
6. Carbajal A, Tallo-Parra O, Sabes-Alsina M et al. (2014). *Feather corticosterone evaluated by ELISA in broilers: a potential tool to evaluate broiler welfare*. Poultry Science 93: 2884–2886.
7. Jenni-Eiermann S, Helfenstein F, Vallat A et al. (2015). *Corticosterone: effects on feather quality and deposition into feathers*. Methods in Ecology and Evolution 6(2): 237–246.
8. Russell E, Koren G, Rieder M et al. (2012). *Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: current status, future directions and unanswered questions*. Psychoneuroendocrinology 37: 589–601.
9. Yu M, Yue Z, Wu P et al. (2004). *The developmental biology of feather follicles*. International Journal of Developmental Biology 48: 181–191.
10. Fries E, Hesse J, Hellhammer J, Hellhammer DH (2005). *A new view on hypocortisolism*. Psychoneuroendocrinology 30: 1010–1016.

Meer referenties over dit onderwerp kunnen bij de auteur worden opgevraagd.

