



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„The excretion of corticosterone metabolites differs between quail
and fowl and between sexes“

Verfasserin

Katharina Spreitzer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, 2010

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 439

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Zoologie (Stzw) UniStG

Betreuer:

Ao. Uni- Prof. Dr. Kurt Kotrschal

Inhaltverzeichnis:

English Paper Article submitted to General and Comparative Endocrinology

Abstract	Seite 4
Introduction	Seite 5
Material and Methods	Seite 7
Results	Seite 11
Discussion	Seite 13
Conclusion & Acknowledgements	Seite 16
References	Seite 17
Figure legends	Seite 20
Table & Figures	Seite 22
Zusammenfassung der Arbeit in deutscher Sprache	Seite 28
Einleitung	Seite 29
Methoden	Seite 31
Ergebnisse und Diskussion	Seite 34
Literatur	Seite 38
Legende	Seite 40
Abbildungen	Seite 41
Auszug	Seite 47
Abstract	Seite 48
Danksagung	Seite 49
Lebenslauf	Seite 50

The excretion of corticosterone metabolites differs between quail and fowl and between sexes

Spreitzer Katharina^{1*}, Hirschenhauser Katharina^{1,2}, Lepschy Michael³, Kotrschal Kurt¹ & Möstl Erich³

¹ Konrad Lorenz Research Station, A-4645 Grünau and Department Behavioural Biology, University of Vienna, A – 1090 Vienna, Austria

² Max Planck Institute for Ornithology, D – 82319 Seewiesen, Germany

³ Department of Natural Sciences / Biochemistry, Veterinary University of Vienna, A – 1210 Vienna, Austria

* Corresponding author: Katharina Spreitzer, Department Behavioural Biology, University of Vienna, Althanstr. 14, A – 1090 Vienna, Austria, kathi.spr@gmx.at, Phone: +43 1 427754462

Abstract

Measuring steroid hormone metabolites from droppings is a useful tool for monitoring hormone patterns without handling the birds. The method is particularly helpful in small specimen, for which repeated handling and blood sampling is not feasible. Knowledge about the metabolites in a species' excreta is essential before immunoreactive measurements are interpreted as biologically relevant. We compared the kinetics of excretion and the metabolization of [³H]-corticosterone in males and females of two galliform species, Japanese quail (*Coturnix japonica*) and domestic fowl (*Gallus gallus* dom.). All animals were injected with [³H]-labeled corticosterone and droppings were collected during the subsequent 48h (quail) and 24h (fowl). The radioactivity (R) was excreted with two maxima in males and females of both species. Presumably, the first R maximum (30 and 60min, male and female quail; 2 and 1.3h, male and female fowl) came from urine excretion, whereas the second R maximum (180 and 210min, male and female quail; 4.5 and 2.5h, male and female fowl) resulted from both, urine and feces. First and second R maximum samples from each individual were selected for qualitative analyses of excreted metabolites using thin layer chromatography (TLC). TLC separated at least seven radioactive corticosterone metabolites (CM) in the droppings of both species; corticosterone itself was not present in droppings. The quantity and quality of excreted CM varied between the sexes in both species, as well as between quail and fowl. Cecum droppings contained excessively high levels of radioactivity and inconsistent CM compositions and, therefore, should be avoided during dropping collection.

Keywords: non-invasive, radiometabolism study, *Coturnix japonica*, *Gallus gallus* dom., glucocorticoids, steroid hormone metabolites, thin layer chromatography

1. INTRODUCTION

Birds and other vertebrates respond to unpredictable physical or social changes of their environment with rapid increases of circulating corticosterone levels. Short-term corticosterone pulses facilitate behavioral and physiological responses to unpredictable events and help the individual to cope with unexpected changes in an adaptive way (Wingfield et al., 1998). For example, sexual motivation and social competition may provoke glucocorticoid responses. However, repeated or long lasting disturbance may result in chronic activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis, which may impair the immune system and parasite resistance (Wingfield et al., 1997; Raouf et al., 2006). This refers to the concept that at certain times an animal has to struggle harder (i.e. expend more energy), to maintain homeostasis ('allostatic load'), which may be viewed as cumulative or sustained physiological changes due to genetic predispositions, previous history, or lifestyle (Romero et al., 2009).

During blood sampling, particularly the handling and restraint of animals causes stress in every individual and number, volume and time-intervals between blood samples are limited by body size. Moreover, repeated sampling of individuals will result in a glucocorticoid response already when the experimenter is seen, i.e. in anticipation of being caught and handled (Dittami, 1981). To avoid the effects caused by the sampling procedure itself, a feedback-free alternative is favorable. A non-invasive alternative to blood sampling is to collect individual droppings for measuring levels of excreted corticoid metabolites. Collection of droppings does not require handling and may be organized with minimum disturbance of the animal's behavior in most species.

Glucocorticoids are secreted by the adrenal glands and quickly eliminated from the blood. They are mainly metabolized by the liver and excreted in the urine and bile as conjugates. In the gut most of them are deconjugated by bacteria and partially reabsorbed. Steroids which are not reabsorbed are eliminated via feces (Taylor, 1971). Bacteria in the microflora of the intestines and the ceca may

be very active in metabolizing steroid hormones. Conjugated steroid metabolites have a higher polarity, are more hydrophilic and can be excreted via urine and feces (Florkin and Stotz, 1963). In birds, renal and fecal excreta are jointly excreted through the cloaca and therefore, CM in droppings of birds are of renal and fecal origin (Klasing, 2005). Levels of excreted steroid metabolites are cumulative and integrative measures over time and therefore, reflecting the glucocorticoid production during an earlier period, as one has to consider the gut-passage time or uric acid production (Goymann, 2005; Goymann and Wingfield, 2004). This can be advantageous, for example, for studying hormonal responsiveness to social environment when the exact timing of a hormonal response may not be known.

Non-invasive measures of steroid hormone metabolites have advanced over the last decade and have been evaluated and applied to an increasing number of species including some galliform birds (domestic fowl, *Gallus gallus f. dom.*: Rettenbacher et al., 2004, Dehnhard et al., 2003; capercaillie, *Tetrao urogallus*: Thiel et al., 2005; black grouse, *Tetrao tetrix*: Baltic et al., 2005). Yet, the non-invasive measurement of excreted corticosteroid metabolites (CM) in droppings of the Japanese quail (*Coturnix japonica*) has not been solved thus far. There are few examples in the literature showing that excreted steroid metabolites may vary between the sexes within a species, presumably due to nutrition and the microfauna of the gut (Touma et al., 2003; Goymann, 2005), and probably metabolites also differ even between closely related species (Palme, 2005). In domestic fowl droppings, excreted CMs have been characterized using radioactively labeled corticosterone (Rettenbacher et al., 2004). To pinpoint a case of comparing CM excretion in closely related species, we performed a comparative radiometabolism study with males and females of Japanese quail and domestic fowl. Ultimately, this study may contribute to characterize and identify the CM excreted in the droppings of Japanese quail for non-invasively monitoring basal activity and reactivity responses of the HPA stress axis in behavioral studies with this common laboratory species.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Study animals

All birds were kept solitarily in cages with about 2m² of space for domestic fowl and 1m² for Japanese quail. We tested 14 domestic fowl and 14 Japanese quail, 7 male and 7 female of each species. The female fowl (2 Altsteirer, 3 bantams, 2 bantam-laying hen hybrids) came from own breeding (KH), male fowl (Dorkings) and Japanese quail came from local private breeders. Visual contact between individuals was prevented. Particularly the male fowl had to be familiarized to their cages prior to the experiment and we allowed two weeks for acclimatization. The Japanese quail and female fowl were calmer than the male fowl and experiments could be started already after three days of acclimatization to the cages. All animals had a wooden floor with sawdust litter, which we removed during dropping collection. The wooden floor probably has absorbed liquid fractions of the urine excretion and thus, parts of the radioactivity excreted via the renal pathway may have got lost. Food and water were supplied ad libitum at all times, both species had the same grain mix diet, but grain for quail was finer milled. Artificial daylight was set from 08:00 to 22:00 h throughout all phases of the experiment. At the end of the experiments body mass was measured to the nearest of 0.5 g using a UWE Handi-Weigh spring balance. In both species males were bigger than females (Tab.1). The experiment was conducted with the permission of the Austrian Amt der Steiermärkischen Landesregierung (FA10A – 78Hi3/2007–1).

2.2. Administration of radiolabelled corticosterone and collection of droppings

After collecting a control dropping (T0), we i.v. injected the [³H]-corticosterone between 09:00 and 10:00h. Each animal was given 0.5ml [³H]-corticosterone that are equivalent to 1.7MBq of [³H]-corticosterone (NET-399; [1, 2, 6, 7-³H (N)]-corticosterone; specific activity: 2830.5 GBq/mmol, New England Nuclear, Dreieich, Germany) dissolved in 1ml of 0.9% NaCl solution containing 10% (v/v) ethanol into the *Vena cutanea ulnaris* (Rettenbacher et al., 2004).

Per trial seven birds of same sex and species were treated and observed, the sequence was male fowl, female fowl, female quail, male quail. After the treatment each dropping was collected by observation during the first three hours (T1 – T3), at an hourly base during the following seven hours (T4 – T10), one sample at lights-off (22:00 h, ~ T12) and one sample 24 h after the injection (T24). We used small plastic bags for collecting the excreta of domestic fowl and 2 ml Eppendorfs for the Japanese quail. We also collected cecum droppings to analytically characterize the CM composition of cecal excreta. Every two hours at maximum the droppings were stored at -20°C. A total of 481 samples were collected. Direct contact with the radioactively contaminated excreta was avoided at all times by using one-way latex gloves. All waste was collected and disposed separately.

2.3. Extraction of excreted CM and radioactivity

The droppings were defrosted rapidly at 40°C and an aliquot of 0.1 g of each dropping was extracted in 500 µl Aqua bidest. and 750 µl of 100% methanol and vortexed for 15 min. After centrifugation, 100 µl of the supernatant were mixed with 12 ml scintillation fluid (Quicksafe A, No. 100800 Zinsser Analytic Maidenhead, UK) to measure radioactivity in a liquid scintillation counter (Tri-Cab 2100 TR, Packard Instruments, Meriden, CT, USA), while running a quench compensation program. After evaporation and redissolving the extract in 100 µl of 100% methanol the extracts were used for thin layer chromatography (TLC).

Furthermore, we tested two methods to deconjugate the excreted CM, i.e. enzymatic (using β -Glucuronidase/Arylsulphatase) and chemical deconjugation (using sulphuric acid) prior to TLC analyses. Six samples were used for the deconjugation tests. For the enzymatic and chemical deconjugation 0.1 µg of the selected samples were extracted with methanol as described above (2.3.). The extracts were acidulated with 10 µl fuming hydrochloric acid and diluted with 10 ml Aqua bidest. We separated the non-polar components from the polar components by loading them onto primed Sep-Pak C₁₈ cartridges (WAT 051910 Quantity 10 Lot No. 028637306B). The cartridges were

washed three times with 10 ml of Aqua bidest. and eluted with 4ml of 100% methanol. The first eluate did not contain any radioactivity, except the background radiation. The second eluate, which contained the methanol-extracted part was evaporated at 40°C under a stream of nitrogen and re-suspended in 1.5 ml ethylacetate. The 1.5 ml re-suspension got divided into three parts, 500 µl each part. One part was used for the enzymatic deconjugation, one for the chemical splitting and one part untreated as control. After the deconjugation treatment all samples were evaporated one more time at 40°C under nitrogen. For the enzymatic deconjugation we added 500 µl β -Glucuronidase / Arylsulphatase (Merck EC 3.2.1.31 and EC 3.1.6.1). The dilution factor of the β -Glucuronidase / Arylsulphatase was 1:100 (in a sodium-acetate-buffer 0.2 mol/l, pH 4.8). The incubation lasted over night at 40°C. For chemical deconjugation we refilled the vial with 4 ml ethylacetate and 10 µl hydrochloric acid. After one hour, 10 µl 5 % sodium bicarbonate were added to stop the chemical reaction. After enzymatic or chemical treatments, the samples were purified one more time through Sep-Pak C₁₈ cartridges, evaporated and re-suspended in 100 µl 100% methanol.

2.4. Thin layer chromatography (TLC)

We selected samples with maximum contents of radioactivity, to separate the excreted CM metabolites based on different chromatographic mobility using TLC with autoradiography. From each sex and species we selected one first maximum excreted radioactivity (R) sample (presumably urine) and one second maximum R sample (presumably feces with urine).

On each TLC sheet, we also spotted three columns of a self composed standard solution, a mixture of the known compounds corticosterone (CC), progesterone (P₄), estrone sulfate (E₁S), cortisol (C) and estrone glucuronide (E₁G). One starting point of the standard solution was applied at the left edge, one in the middle and one at the right edge (Fig. 1). Between the standard samples we applied the extracts of both, the enzymatically and chemically deconjugated samples for comparison with standards. Then each sheet was placed in three different solvents (mobile phase): first into solvent A

that contained chloroform, methanol and aqua bidest., at the rate of 10: 5:2, then into solvent B that contained chloroform and acetone, at the rate of 20:5, and at last into solvent C that contained chloroform acetone, at the rate of 20:1. Total distance traveled by solvent A was 6 cm, 10 cm for solvent B and 16 cm for solvent C. The samples were spotted onto the plate using a Linomat (CAMAC Muttenz/ Switzerland). The radioactive spots on the plates were visualized in a beta-imager (Biospace Lab, France). In these images the bright color intensity of one or more bands indicates the presence of radioactivity (i.e. [³H]-labeled CM). To compare the TLC separated compounds with the known standard compounds we calculated the substance-specific retention factor (R_f). The R_f value is the ratio of the distance of the compound has migrated divided by the distance the solvent has migrated, and by definition has a maximum value of 1 (Vermerris and Nicholson, 2009).

2.5. Statistics

For the excretion pattern of radioactivity over the day, individual samples were assorted according to hours post-treatment and plotted as median Bq/mg levels from N individuals per hour. We also calculated the minutes until the first and second peak of excretion to compare individual delay times of excreting the radioactive label. Individual peak excretion was defined as Bq/mg greater than the individual mean (i.e. sum of excreted radioactivity within the ten hours post-treatment divided by the number of droppings per bird) plus 1 standard deviation. Delay time between injection and peak excretion fulfilled the assumptions of normal distribution (Shapiro-Wilk test, quail: $W = 0.97$; $n = 13$; $p = 0.8$; fowl: $W = 0.89$; $n = 13$; $p = 0.1$) and males were compared with females using t -tests with SigmaStat 11.1.0 (Systat, 2008).

3. RESULTS

3.1. Excretion of radioactivity

Males and females of both species excreted the radioactivity as a pattern with two maxima in 24h (Fig. 2). Male and female quail had relatively similar delay times between treatment and peak R excretion (first R maximum: after 30 and 60 min; second maximum: after 180 and 210 min, males and females respectively). In the fowl, males took longer than females to excrete the radioactivity (first R maximum: 2 and 1.3 h; second R maximum: 4.5 and 2.5 h, males and females respectively; Fig. 3). For simplicity, we will refer to the second R maximum sample as 'feces'. Male fowl took significantly longer than female fowl for fecal excretion ($t = 2.3$; $n = 6 / 7$; $P = 0.04$), while urine excretion times were similar in male and female fowl ($t = 1.2$; $n = 7 / 7$; $P = 0.2$). In quail, excretion times were similar in males and females (urine: $t = 0.9$; $n = 7 / 7$; $P = 0.4$; feces: $t = 0.6$; $n = 7 / 7$; $P = 0.6$).

The enzymatic and chemical deconjugation did not cause a change in our chromatographic plates. The first eluate of the primed Sep-Pak C₁₈ cartridges during the chemical deconjugation contained only minor background radiation. Thus, as expected, the majority of the excreted [³H]-marked CM was solved in the methanol phase. Cecum droppings from quail (1 male and 5 female) mostly contained higher radioactivity levels than the peaks measured in non-cecum excreta. We also observed a wide range of R in cecum droppings; for example we had 130.9 Bq/mg in a cecum dropping that was displaced six hours post-treatment, while another cecum dropping deposited seven hours post-treatment contained 12.5 Bq/mg. Thus, it seems unpredictable how much radioactivity may occur in cecum droppings.

3.2. TLC

We compared the presence of radioactive compounds in the TLC- autoradiograms of first and second R maximum samples from male and female quail and fowl. Radioactive CM excreted in quail and fowl droppings typically showed a chromatographic mobility as shown in Figure 1. The separated CM were highly polar, as detectable TLC bands appeared best in the solvent A containing methanol. Both acetonic solvents (B and C) did not elute any radioactive particles. The TLC - autoradiograms allowed distinguishing bands in all samples from both species. Second R maximum droppings from fowl contained a higher number of metabolites than first R maximum samples; in quail a similar number of compounds were separated in droppings from first and second R maxima. However, in both species only a minority of bands eluted with identical R_f values, as well as in males and females, and in first and second maximum samples (Fig. 4). Thus, the first and second R maximum droppings were composed of different CM, which underlines the assumed distinction between a renal and a fecal pathway.

The majority of separated compounds containing R remained unknown. However, in both species some of the bands co-eluted with R_f close to the R_f of known standards, in particular estrone-conjugates. In female quail, for example, first and second R maximum samples eluted with seven bands, three of which could be identified (estrone-glucuronide, estrone-sulphate and cortisol); the remaining four bands were not identical between first and second R maximum samples (Fig. 4). Also in droppings from male quail and fowl a varying number of radioactive CM was separated in the TLC, only two of which were similar to the known standards, i.e. estrone-glucuronide and estrone-sulphate (Fig. 5). Remarkably, none of the samples contained corticosterone itself.

Dropping samples contaminated with cecum generally eluted a higher number of bands than first and second R maximum samples. Thus, the radioactive labeled compounds detected in cecum

samples seem to have been subject to a higher degree of metabolization than non-cecum droppings (Fig. 4).

4. Discussion

Japanese quail are common lab animals, due to their small body size and the fast alternation of generations. Yet, the non-invasive monitoring of glucocorticoids in quail droppings has been problematic so far. The presented radiometabolism study shows that corticosterone metabolites (CM) of extremely high polarity are excreted in the droppings of both species, but no corticosterone itself. Furthermore, the radioactivity was excreted with two radioactivity (R) maxima, probably representing renal versus fecal origin. And finally, chromatographic separation revealed different CM in first and second R maximum droppings, as well as between sexes and even between closely related species.

In mammals, urine with maximum R was collected already during treatment with radio-labeled (infusion) or in the first sample after treatment. Maximum R in feces took much longer, for example, 12 h in sheep, or 48 h in pigs (Palme et al., 1996). In birds urine and feces are jointly excreted through the cloaca. Thus, the first R maximum from renal excretion cannot be measured separately with a catheter as in mammals. Therefore, we cannot exclude whether there might be a maximum R excretion into the cloaca prior to the first dropping we were able to collect. However, in no case we measured a maximum R in the first dropping collected after treatment. The second R maximum was in the range of hours rather than days, thus, our two bird species had faster gut pathways than the domestic mammals.

The excretion patterns of radioactivity based on injected [³H]-marked corticosterone clearly exemplified that even in birds excretion occurs with two major intervals. Assumingly, the first maximum represented the more rapid CM excretion via urine and the second was from the longer

fecal pathway. Taken strictly, in birds feces and urine always are joined in the cloaca before excretion and, therefore, fecal material will always be contaminated with urine (Klasing, 2005). Our data on excreted R allowed distinguishing faster urine from a slower fecal pathway. The first maximum of radioactive excretion was of pure renal origin (with a non-radioactive fecal part), whereas the second maximum probably represented fecal R excretion combined with urine (Möstl et al., 2005). Even though the two routes of excretion of CM have been discussed before as a potential source for bias of metabolisation rates in other bird species (Goymann et al., 2002; Hiebert et al., 2000), we now present both, qualitative and quantitative evidence from two closely related galliform species. The regular feeding behavior of quail and fowl in the lab setting and their relatively frequent defecation rates (2.0 ± 0.7 per hour in quail and 2.8 ± 0.9 per hour in fowl) were probably advantageous as compared with disrupted feeding periods in passerines (Goymann et al., 2002) or the rather irregular feeding events in owls (Wasser et al., 1997). The 180 min gut passage time in male quail (Fig. 3) was in accordance with a previous study based on edible dye and effects of GnRH – treatment on androgen metabolites in droppings of male quail (Hirschenhauser et al., 2008).

The quantity of excreted R did not vary between first and second R maximum samples and also not between males and females. However, we were not able to evaluate the total recovery of radioactivity as the wooden floor probably absorbed some of the R excreted via liquid urine parts. For better results future studies preferably may chose a non-absorbing floor or plastic sheets. For the practical aspect of collecting droppings either first R maxima (faster renal pathway) or second R maxima (longer gut pathway) may be chosen, however, mixing the two pathways is not recommendable. This may be different in mammals: in mice, for example, females excreted the majority of R via urine whereas males excreted most of the administered R via feces (Touma et al., 2003). However, with regard to gut passage time (i.e. delay times between treatment and R excretion), the large domestic fowl males took longer than quail males before excreting maximum R, while female fowl were even faster than the much smaller female quail (Fig. 3, second R maximum).

This illustrates that when comparing species, gut passage time may not be regarded as a simple function of the body size.

In no case corticosterone was present in the droppings, at most glucocorticoid metabolites. Moreover, there were hardly any metabolites even in the proximity of corticosterone (Figs. 4 and 5), thus, the use of immunoassays, which are highly specific for corticosterone, is not recommended.

Chromatographic separation (TLC) of samples with maximum R content revealed different CM in the excreta from males and females. This sex-specific difference in the metabolization of glucocorticoids occurred in both species studied and might well be common in galliforms. Similar sex-specific patterns have been reported for one passerine bird species (*Saxicola torquata*, Goymann, 2005) and for mice (*Mus musculus* f. domesticus, Touma et al., 2003) while in other birds, such as geese (*Anser anser*) and penguins (*Pygoscelis adeliae*) the major excreted CM were more similar in males and females (Nakagawa et al., 2003; Möstl et al., 2005). Even though speculative, potentially, the results from galliforms imply that females might handle stress load in a different way than males, because of different clearance rates (Fig. 3) and a more variable degree of metabolization (Fig. 4). However, our results suggest that sex-specific variation definitely should be part of validation routines.

Finally, we report a large number of various radioactive CM in cecum droppings from quail, as well as from fowl. Usually, the cecum excreta have a different consistency, color and smell than non-cecum excreta. Cecal material has been exposed to microbes for a longer time and thus, assumingly steroid compounds may have been metabolized to a higher degree than in non-cecum fecal excreta (Klasing, 2005). CM measurements from cecum-material remain unpredictable as long as we cannot determine how long the dropping material had been deposited (and subject to microbial degradation) inside the ceca before being excreted. Therefore, in practice collection of cecum

droppings should be avoided, as they contain a large number of different CM and potentially extended retention times as compared with non-cecum droppings.

5. Conclusion

This comparative study in quail and fowl shows that even in closely related species glucocorticoids are excreted as different metabolites and that there is also a sex-specific difference within species. Our results revealed that each dropping contained several different metabolites, while remarkably corticosterone itself was not measurable in urine or feces. Cecum droppings contained a high number of metabolites, which differed from CM observed in non-cecum droppings.

Acknowledgements

We are thankful for the precious assistance by F. Schachinger during the experiments and by A. Kuchar in the laboratory, for funding by the University of Vienna (KS) and the Alexander von Humboldt Stiftung (KH).

5. References

- Baltic, M., Jenni-Eiermann, S., Arlettaz, R., Palme, R., 2005. A noninvasive technique to evaluate human-generated stress in the black grouse. *Ann. NY Acad. Sci.* 1046, 1 - 15.
- Dittami, J.P., 1981. Seasonal changes in the behavior and plasma titers of various hormones in barheaded geese, *Anser indicus*. *Can. J. Zool.* 61, 2695 - 2697.
- Florkin, M., Stotz, E.H., 1963. *Comprehensive Biochemistry. Sterols, bile acids and steroids.* Vol. 10, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York.
- Goymann, W., 2005. On the importance of biological validations: lessons from stonechats and spotted hyenas. *Ann. NY Acad. Sci.* 1046, 35 - 53.
- Goymann, W., Möstl, E., Gwinner, E., 2002. Corticosterone metabolites can be measured noninvasively in excreta of European stonechats (*Saxicola torquata rubicola*). *Auk* 119, 1167 - 1173.
- Goymann, W., Wingfield, J.C., 2004. Allostatic load, social status and stress hormones: the costs of social status matter. *Anim. Behav.* 67, 591 - 602
- Hiebert, S.M., Ramenovsky, M., Salvante, K., Wingfield, J.C., Gass, C.L., 2000. Noninvasive methods for measuring and manipulating corticosterone in hummingbirds. *Gen. Comp. Endocrinol.* 120, 235 - 247.
- Hirschenhauser, K., Wittek, M., Johnston, P., Möstl, E., 2008. Social context rather than behavioral output or winning modulates post-conflict testosterone responses in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Physiol. Behav.* 95, 457 - 463.
- Klasing, K.C., 2005. Potential impact of nutritional strategy on non-invasive measurements of hormones in birds. *Ann NY Acad Sci* 1046, 5 - 16.
- Möstl, E., Rettenbacher, S., Palme, R., 2005. Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: an analytical approach. *Ann. NY.Acad. Sci.* 1046, 17 - 34.

- Nakagawa, S., Möstl, E., Waas, J.R., 2003. Validation of an enzyme immunoassay to measure faecal glucocorticoid metabolites from Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*): a noninvasive tool for the measurement of stress? *Polar Biol.* 26, 491 - 493.
- Palme, R., Fischer, P., Schildorfer, H., Ismail, M.N., 1996. Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. *Anim. Reprod. Sci.* 43, 43 - 63.
- Raouf, S.A., Smith, L.C., Bomberger Brown, M., Wingfield, J.C., Brown, C.R., 2006. Glucocorticoid hormone levels increase with group size and parasite load in cliff swallows. *Anim. Behav.* 71. 39 – 48.
- Rettenbacher, S., Möstl, E., Hackl, R., Ghareeb, R., Palme, R., 2004. Measurement of corticosterone metabolites in chicken droppings. *Br. Poult. Sci.* 45, 704 - 711.
- Romero, M.J., Dickens, M.J., Cyr, N.E., 2009. The reactive scope model — a new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. *Horm. Behav.* 55, 375 - 389.
- Taylor, W., 1971. The excretion of steroid hormone metabolites in bile and faeces. *Vitam.Horm.* 29, 201 - 285.
- Thiel, D., Jenni-Eiermann, S., Palme, R., 2005. Measuring corticosterone metabolites in droppings of capercaillies (*Tetrao urogallus*). *Ann. NY. Acad. Sci.* 1046, 1 - 13.
- Touma, C., Sachser, N., Möstl, E., Palme, R., 2003. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and faeces of mice. *Gen. Comp. Endocrinol.* 130, 267 - 278.
- Vermerris, W., Nicholson, R., 2009. Phenolic Compound Biochemistry. Springer Science + Business Media B.V., p. 167.
- Wasser, S.K., Bevis, K., King, G., Hanson, E., 1997. Noninvasive physiological measures of disturbance in the Northern spotted owl. *Conserv. Biol.* 11, 1019 - 1022.
- Wingfield, J.C., Maney, D.L., Breuner, C.W., Jacobs, J.D., Lynn, S., Ramenofsky, M., Richardson, R.D., 1998. Ecological bases of hormone behaviour interactions: The emergency life history stage. *Am. Zool.* 38, 191 - 206.

Wingfield, J.C., Breuner, C., Jacobs, J., 1997. Corticosterone and behavioural responses to unpredictable events. In: Harvey S., Etches R.J. (Eds.), *Perspectives in Avian Endocrinology*. Society for Endocrinology, Bristol, pp. 267 - 278.

6. Figure legends

Figure 1: Example of a TLC image. At the left, in the middle and at the right edge the standard sample was applied. Bands eluted from the bottom upwards: estrone-glucuronide, estrone-sulphate, cortisol, corticosterone and progesterone. The six columns between standards visualize the bands eluted from one individual sample of a male quail.

Figure 2: Excretion patterns of radioactivity in male (filled bars) and female (hatched bars) quail and fowl. Bars represent mean ($\pm$ SE) Bq/mg per 30 min until 4 h after treatment with [3 H]-corticosterone, at hourly intervals from 4 h until 12 h, and after 24 h and 48 h. $n = 7$ per sex and species, but sample sizes in each bar may vary due to individual defecation rates.

Figure 3: Mean ($\pm$ SE) delay time (minutes) between treatment and maximum R excretion, representing [3 H]-labeled corticosterone metabolites, in male and female domestic fowl and Japanese quail. First R maxima assumingly represented renal excreta (urine), second R maxima assumingly represented fecal excreta.

Figure 4: R_f -Values of each species and sex of normal droppings and cecum droppings and the R_f -values of the standards (0.1 is estron-glucuronide; 0.2 is estrone-sulphate, 0.3 is cortisol, 0.4 is corticosterone and 0.8 is progesterone). The bands show how many different metabolites have been found in the dropping. All bands are within the first solvent A.

Figure 5: Radiograms based on TLC images from one example individual per sex and species. Arrows indicate distances traveled by known standard compounds (E_1G : estrone-glucuronide, E_1S : estrone-sulphate, C: cortisol, CC: corticosterone and P_4 : progesterone). Thin lines are first R maximum samples (presumably urinary excretion), thick lines represent second R maximum samples of female

quail and fowl to visualize the differences. Vertical grey reference lines indicate the positions of eluted substances in fecal droppings (i.e. second R maximum samples).

Table 1: Individual body mass for male and female quail and fowl sampled in this study

	Male	Female	Male	Female
	fowl (kg)	fowl (kg)	quail (g)	quail (g)
	2.5	1.5	331	273
	2	1.2	280	265
	2.5	1.3	281	271
	2.5	1.9	267	268
	2.5	1.0	276	265
	2.5	1.1	282	270
	2.5	1.7	278	275
Mean	2.4	1.3	285	269.6
SE	0.9	0.5	107.7	101.9

Figure 1

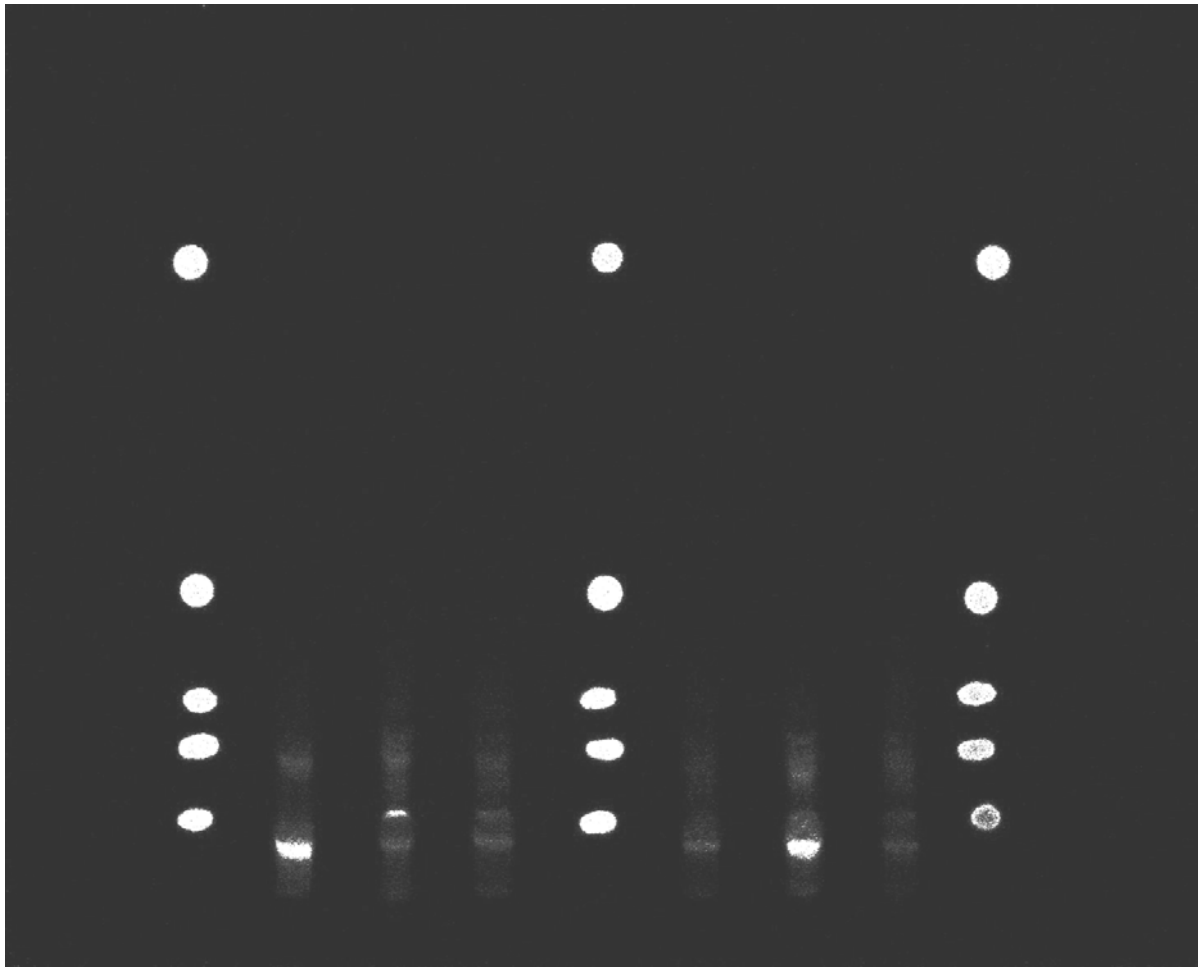


Figure 2

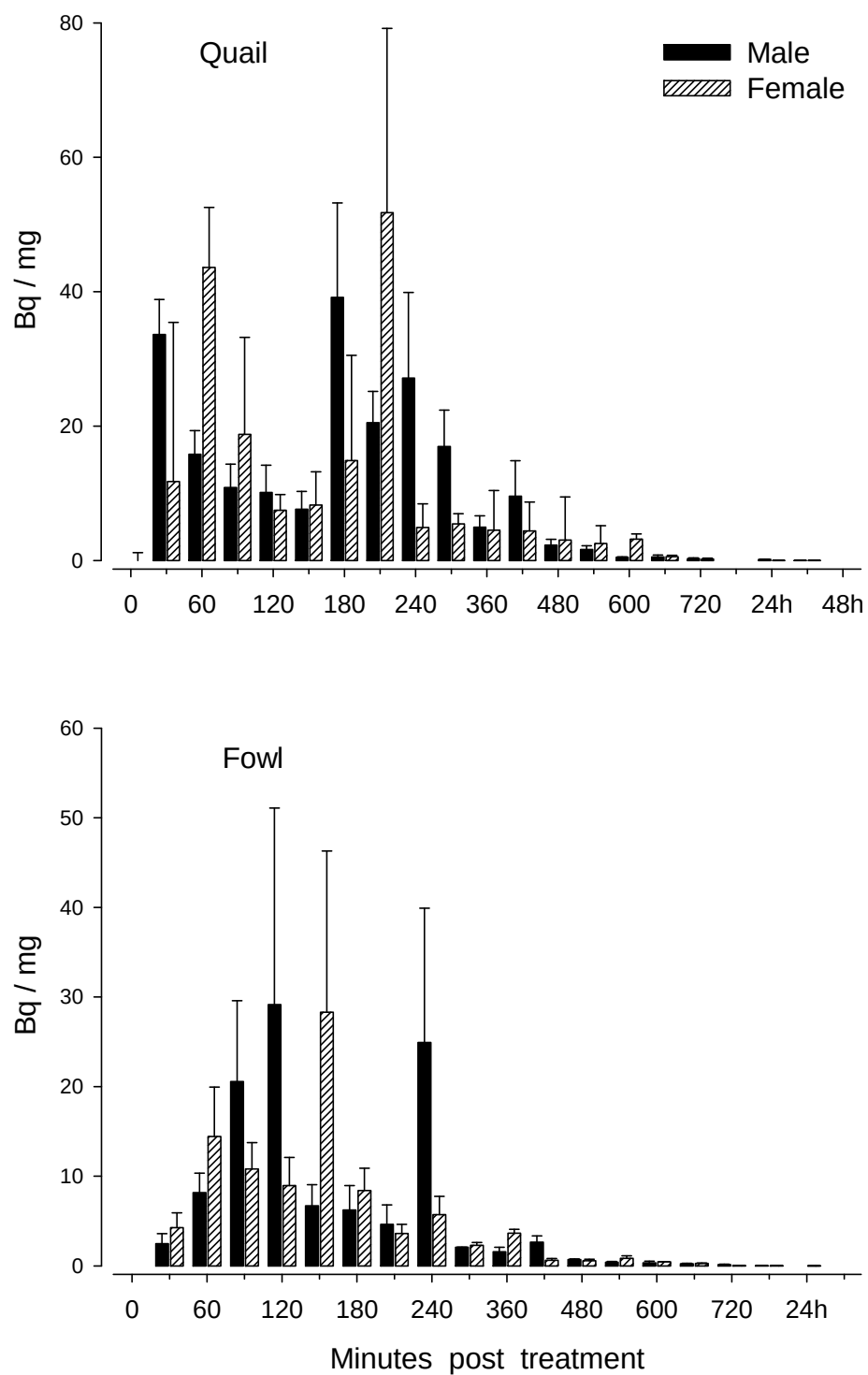


Figure 3

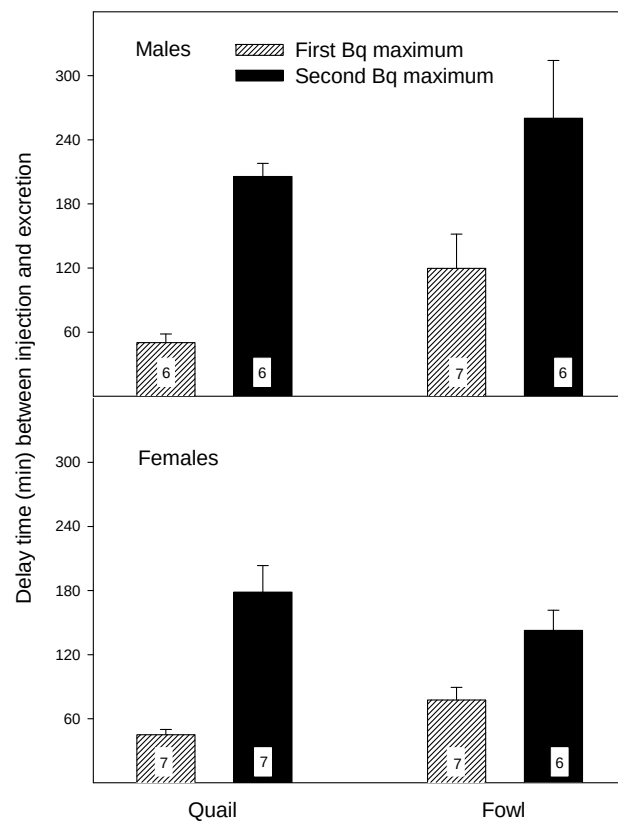


Figure 4

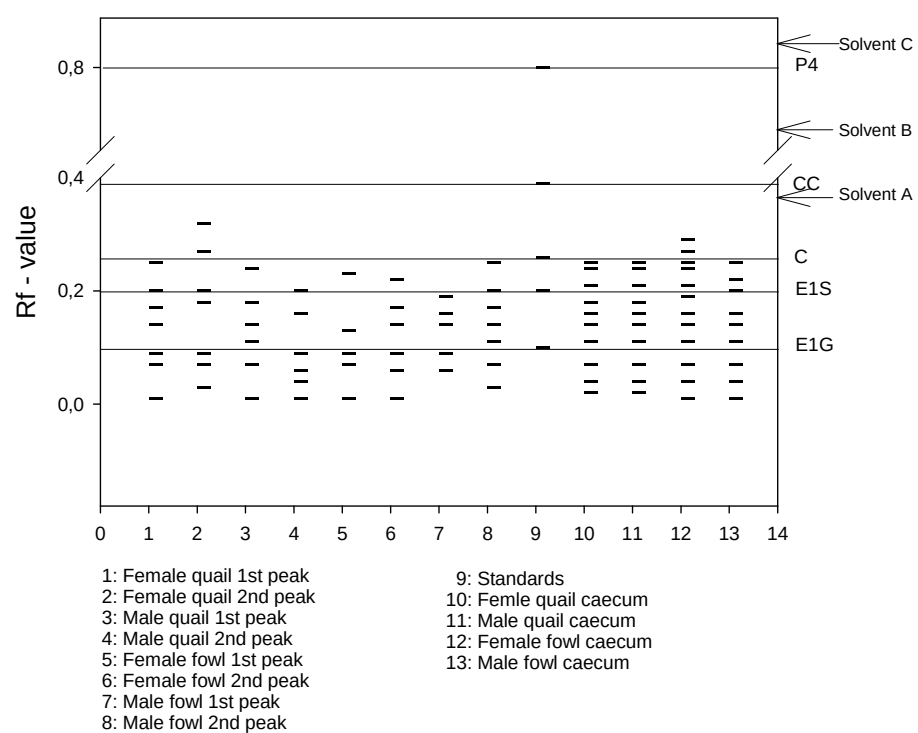
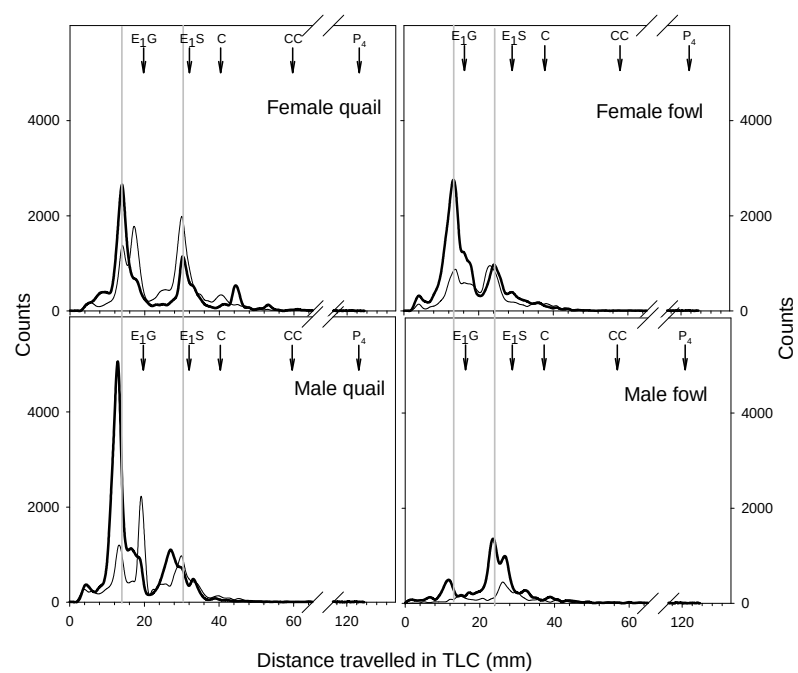


Figure 5



Ausscheidungsverlauf und Ausscheidungsmetaboliten von
Kortikosteron bei Wachteln und Hühnern

1. Einleitung

Wachteln (*Coturnix japonica*) eignen sich durch ihre schnelle Generationsfolge und ihre kleine Größe sehr gut als Labortiere. Die Messung der Ausscheidungsmetaboliten von Kortikosteron erwies sich jedoch, im Gegensatz zum Haushuhn, als bisher nicht durchführbar. Ziel dieser Diplomarbeit war es, Ausscheidungsverlauf und Eigenschaften von Kortikosteronmetaboliten im Kot von zwei Hühnervogelarten, den Wachteln und den Hühnern (*Gallus gallus domesticus*) darzustellen. Kortikosteron gehört zu den Glukokortikoiden, das sind Nebennierenrindenhormone, deren Konzentration bei Belastung ansteigt um zusätzliche Energien zu mobilisieren.

Bei Belastung (Stress) kommt es zur Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse). Im Hypothalamus wird Corticotropin Releasing Hormone (CRH) ausgeschüttet. Die Adenohypophyse setzt daraufhin Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) frei, welches über das Blut zur Nebennierenrinde gelangt und zur Synthese und Sekretion von Kortikosteroiden (Glukokortikoide) führt. Diese fettlöslichen Steroidhormone werden in der Leber metabolisiert, über die Nieren in den Urin abgegeben bzw. über die Galle in den Darm und über den Kot abgegeben (PALME et al. 2005).

Traditionellerweise wurden Glukokortikoide und andere Steroidhormone im Blutplasma oder Serum gemessen. Besonders bei der Messung von Stresshormonen sind Blutentnahmen problematisch, da die meisten Tiere einerseits schon beim Anblick des Fängers bzw. des Handlings eines anderen Individuums eine konditionierte Reaktion (z.B. Hormonausschüttung) zeigen (Dittami 1981). Bei kleinen Tieren ist die Blutmenge limitiert und wiederholte Probeentnahmen sind nur begrenzt möglich. Weiters kann ein wachsender Gewöhnungseffekt die Vergleichbarkeit der Proben stark beeinflussen. Nicht - invasive Methoden sind für das Tier nicht Stress erzeugend, nach analytischer Etablierung ohne größeren Aufwand zu sammeln und für Zootiere ebenso wie für frei lebende Tiere anzuwenden.

Die Zusammensetzung dieser Metaboliten im Kot ist artspezifisch sehr verschieden und hängt zum größten Teil mit der Ernährung und Mikrofauna im Darm zusammen. Ein Assay (ein standardisierter Reaktionsablauf zum Nachweis einer Substanz mit einer spezifischen Methode), der sich also bei einer Art als sinnvoll erwiesen hat, muss nicht unbedingt auch bei einer anderen Art gleich gut funktionieren. Korrekterweise sollten deshalb Hormonmetabolitenmessungen aus Kotproben jeder neuen Art analytisch (biochemisch), physiologisch (quantitativ) und biologisch (angewandt) geprüft und validiert werden (Palme et al. 1996; Palme 2005; Goymann et al. 2005; Touma et al. 2003; Buchanan & Goldsmith 2004; Hirschenhauser et al. 2005). Bei Hühnern hat sich gezeigt, dass die Summe aller immunreaktiven Metaboliten im Kortison Assay höher war, als die im Kortikosteron- und Tetrahydrokortikosteron Assay gemessenen Verbindungen (Rettenbacher et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie und radioaktiven Markern die Ausscheidungsmetaboliten von Kortikosteron bei Hühnern und Wachteln analysiert. Die Dünnschichtchromatographie ist ein Trennverfahren, das zur Untersuchung der Zusammensetzung von Proben genutzt wird. Primäres Ziel war es, die Ausscheidungsform und den Ausscheidungsverlauf von Kortikosteron im Kot dieser Vögel qualitativ und quantitativ nachzuweisen.

Bei Vögeln ist der Blinddarm paarig. Hühner- und Entenvögel haben besonders lange Blinddarmsäcke, welche Verdauungsfunktionen übernehmen. Blinddarmlosung unterscheidet sich in Konsistenz, Farbe und beißendem Geruch von „normalem“ Losungsmaterial. Über die Vergleichbarkeit von Hormonmessungen aus solchen Proben ist in der Literatur nichts bekannt (Klasing 2005). Um zu testen, ob die Verweildauer und spezifische Fauna im Darm einen Einfluss auf die Zusammensetzung und Metabolisierung der Steroide hat, habe ich zusätzlich Blinddarmlosung gesammelt und die Zahl und Eigenschaften der darin vorliegenden Kortikosteronmetaboliten gemessen.

2. Methoden

Es wurde radioaktiv [^3H]-markiertes Kortikosteron injiziert und dessen Ausscheidungsform und Zeitverlauf dargestellt. Der Versuch wurde an zwei nahe verwandten Hühnervogelarten durchgeführt: Wachteln (*Coturnix japonica*) und Haushühnern (*Gallus gallus domesticus*). Es wurden Hühner (7 Hähne und 7 Hennen) sowie Japanwachteln (7 Hähne und 7 Hennen) einzeln in Gehegen in einem umgebauten Dachboden in Großreifling gehalten. Die Hähne, es handelte sich um deutsche Lachshähne, mit einer durchschnittlichen Körpermasse von 2420 g, wurden bereits zwei Wochen vor Beginn des Versuchs dort eingesetzt, um sie an diese Form der Haltung zu gewöhnen. Die Hennen waren steirische Zwerghennen, mit einer durchschnittlichen Körpermasse von 1240 g. Hähnen und Hennen standen je Tier 2 m² zur Verfügung. Für die Wachteln war 1 m² Käfigfläche pro Vogel ausreichend. Alle Versuchstiere hatten Holzboden mit Einstreu aus Sägespänen, sowie ad libitum Zugang zu Wasser und der gewohnten Futtermischung.

Nach Abgabe einer Losung als „Kontrollprobe“ zwischen 8:00 und 9:00h wurde die Behandlung mit [^3H]-markiertem Kortikosteron gestartet.¹ Jedes Tier wurde mit je 1.7 MBq von [^3H]-markiertem Kortikosteron ([NET-399; [1, 2, 6, 7-3H(N)]-corticosterone; 2830.5 GBq/mmol; New England Nuclear, Dreieich, Germany]) gelöst in 0.5 ml physiologischer Lösung (0.9 % NaCl) in die Flügelvene injiziert (Rettenbacher et al. 2004; Baltic et al. 2005). Ab diesem Zeitpunkt wurde jede Losung vollständig gesammelt und spätestens alle 2h bei –20°C tiefgefroren gelagert. Alle Arbeiten wurden mit Latexhandschuhen durchgeführt, um direkten Hautkontakt mit radioaktiv kontaminierten Exkrementen zu vermeiden. Verbrauchsmaterial wurde getrennt gesammelt und entsorgt. Es wurden insgesamt 481 Losungen gesammelt.

2.1. Dünnschichtchromatographie – Thin Layer Chromatography (TLC)

Im Labor wurden die Lösungs-Proben aufgetaut und von jeder Probe wurden 100 mg in Eppendorfcups eingewogen. Danach wurden die lipophilen Bestandteile der Proben extrahiert. Hierzu wurden zu den 100 mg jeder Probe 0.5 ml Wasser und 0.75 ml Methanol gegeben und diese Lösung 15

¹ Tierversuch genehmigt durch die Steiermärkische Landesregierung (FA10A – 78Hi3/2007–1)

Minuten lang, 100 Mal pro Minute, geschüttelt. Methanol löst (extrahiert) die fettlöslichen Steroidmetaboliten aus der Lösung in wässriger Phase. Nach dem Schütteln wurden die Proben eine Minute lang zentrifugiert, um die faserigen / festen Bestandteile der Probe vom flüssigen Extrakt zu trennen. Auch die Caecumproben wurden immer gleich behandelt.

Aus dem wässrigen Extrakt wurden 100 µl für die Radioaktivitätsmessung herangezogen. Weitere 200 µl wurden für die Dünnschichtchromatographie benötigt. Da man den Wasseranteil der Lösung für die Dünnschichtchromatographie nicht braucht, wurden die 200 µl unter Stickstoff eingedampft und mit 100 µl Methanol wieder aufgenommen. Davon wurden 50 µl mittels Linomat auf die Dünnschichtchromatographieplatten (Kieselgel 60, F254) strichförmig aufgesprüht.

Auf jede Platte wurden dreifach Standardproben mit bekannter Zusammensetzung zum Vergleich aufgetragen. Die Standardprobe enthielt Progesteron, Kortikosteron, Kortisol, Östronsulfat und Östronlucuronid. Die Standardprobe wurde am linken Rand, in der Mitte und am rechten Rand der Platte aufgetragen, dazwischen wurden immer drei Extrakte der Kotproben aufgetragen (Abb. 1 – Abb. 4).

Jedes Chromatogramm wurde in drei verschiedenen Lösungsmittelgemischen entwickelt (mehrfache Chromatographie), wobei Lösungsmittelgemische mit abnehmender Polarität verwendet wurden um den großen Polaritätsbereich der ausgeschiedenen Metaboliten abzudecken. Zwischen den Chromatographieschritten wurden die Platten im Trockenschrank getrocknet (50°C). Nach der dritten Chromatographie erfolgte die Trocknung mittels eines Föhns und die Zonen (Spots), an denen sich Radioaktivität auf der Platte befand wurden mittels eines β -Imager detektiert. Hoch polare Metaboliten weisen in diesem chromatographischen System nur eine kurze Laufstrecke auf, hingegen wanderten apolare Metaboliten deutlich weiter. In meinem Versuch wurden drei verschiedene Lösungsmittel pro Platte verwendet. A): Chloroform, Methanol und Aqua bidest. im Verhältnis 10: 5: 2, mit einer Laufstrecke von 6 cm; B): Chloroform und Aceton im Verhältnis 20:5, mit einer Laufstrecke von 10 cm; C): Chloroform und Aceton im Verhältnis 20:1, mit einer Laufstrecke von 16 cm.

2.2. Enzymatische und chemische Spaltung

Weiters untersuchte ich, ob die polaren Metaboliten nach enzymatischer Dekonjugation bzw. Säurehydrolyse ein anderes chromatographisches Verhalten aufweisen. Steroidhormone sind schwer wasserlöslich. In ihrer Ausscheidungsform liegen sie als Glukuronide (an Glukuronsäurereste gebunden) oder als Sulfate (an Schwefelsäurereste gekoppelt) vor. In dieser Form haben sie eine hohe Polarität, d.h. sie sind (wasser-)löslicher und machen somit den „(Ab-)Transport“ über die Nieren und den Darmweg möglich. Diese können auf enzymatischem oder chemischem Weg in messbare Form umgesetzt werden.

2.3. HPLC – High Performance Liquid Chromatography – Hochflüssigkeitschromatographie

Um verschiedene immunreaktive Kortikosteronmetaboliten in den Extrakten der Kotproben zu ermitteln, wurde eine High performance liquid chromatography – Chromatographie (HPLC) an ausgewählten Proben angewandt. Dafür habe ich acht extrahierte Proben verwendet. Von jeder Spezies wurden ein männliches und ein weibliches Individuum herangezogen und von jedem Individuum wurden eine Probe des ersten Ausscheidungsmaximums und eine des zweiten Ausscheidungsmaximums ausgewählt, das waren Proben, die die höchsten radioaktiven Mengen enthielten. Ebenfalls waren diese zwei Proben interessant für mich, da ich sehen wollte, ob es einen Unterschied in der Verweildauer im Darm gibt, da ja der Harnanteil (erstes Ausscheidungsmaximum) früher ausgeschieden wird, als der Kotanteil (zweites Ausscheidungsmaximum).

Von jeder Fraktion wurde die Radioaktivität mittels Szintillationszähler bestimmt. Mittels Enzymimmunoassays wurden im Labor zwei Gruppen von Glukokortikoidmetaboliten bestimmt, nämlich immunreaktives Kortison (wie bei Rettenbacher et al. 2004) und Tetrahydrokortikosteron. Für jede Probe wurden die drei Messungen entlang derselben x-Achse dargestellt. Eine Überlappung von Radioaktivität und Immunreaktivität im Immunogramm würde bestätigen, dass der Hormonmetabolit, den ich messe ein Hauptausscheidungsprodukt in dieser Probe ist und somit messbar wäre.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Ausscheidungsverlauf

Bei beiden Arten zeigen sowohl Männchen als auch Weibchen in ihrem Ausscheidungsverlauf zwei Peaks. Der erste Peak, das erste Ausscheidungsmaximum, zeigt den Urinanteil der Kotprobe mit ihren Kortikosteronmetaboliten, da der Weg über die Nieren schneller geht. Der zweite Peak, das zweite Ausscheidungsmaximum, repräsentiert den längeren Weg über die Darmpassage. Da bei Vögeln die Ausscheidungsprodukte in der Kloake enden, ist genau genommen der zweite Peak, immer mit einem gewissen Urinanteil kontaminiert (Klasing 2005).

Aufgrund des saugfähigen Bodens konnten Teile der ausgeschiedenen Flüssigkeit nicht wiedergewonnen werden, daher war mir auch keine prozentuelle Wiederfindung der verabreichten Radioaktivität möglich. Zu erwähnen ist auch, dass bei Verwendung von Tritium als Marker, dieses auch abgespalten werden kann, wenn z.B. Hydroxylierung an den Positionen stattfinden, an denen das Ausgangsprodukt tritiummarkiert ist.

Bei den Wachteln erschien der erste Peak bei Männchen nach 30 Minuten und bei den Weibchen nach 60 Minuten, der zweite Peak nach 180 Minuten bzw. 210 Minuten. Bei den Hühnern erschien der erste Peak bei den Männchen nach 120 Minuten und bei den Weibchen nach 80 Minuten, der zweite Peak nach 270 Minuten bzw. 150 Minuten. Zeitlich gesehen, waren bei den Wachteln die Männchen und die Weibchen ungefähr gleich schnell beim Ausscheiden der radioaktiv markierten Substanzen. Bei den Hühnern waren die Weibchen deutlich schneller als die Männchen. Kortikosteronausscheidung war bei den kleineren Wachteln schneller, als bei den größeren Hühnern. Die kleinen Wachtelhennen haben gleich lange bis hin sogar länger gebraucht als die doch deutlich größeren Hühner. Das bedeutet, dass Darmpassagezeiten nicht unbedingt als direkte Funktion der Körpergröße anzunehmen sind.

3.2. Dünnschichtchromatographie (TLC)

Für die Dünnschichtchromatographie wurden von jedem Individuum die Metaboliten eines ersten Ausscheidungsmaximums und eines zweiten Ausscheidungsmaximums verglichen. Die Metaboliten sind nur im Lösungsmittel A gewandert, welches Wasser enthält, die Radioaktivität konnte überwiegend im startnahen Teil des Chromatogramms nachgewiesen werden. Somit handelt es sich um polare Metaboliten (Abb. 1 - Abb. 4).

Die Ergebnisse der Dünnschichtplatten haben mir weiters erlaubt, die beiden Arten und Geschlechter mittels der Banden (= Metaboliten) zu vergleichen und zu beschreiben. Bei den Hühnern, bei beiden Geschlechtern, enthielten die zweiten Ausscheidungsmaxima mehr Metaboliten als die ersten Ausscheidungsmaxima. Bei den Wachteln, bei beiden Geschlechtern, hatten beide Ausscheidungsmaxima eine ähnliche Anzahl an Metaboliten, aber unterschiedliche Metaboliten. Diese Daten zeigen, dass auch bei Vögeln, ein schnellerer Ausscheidungsweg über die Nieren von einem langsameren über den Darm unterschieden werden kann.

Um die TLC-Laufstrecke der Metaboliten untereinander genauer vergleichen zu können, habe ich den Retentionsfaktor (Rf-Wert) ausgerechnet. Die Rf-Werte in der Dünnschichtchromatographie erlauben einen quantitativen Vergleich zwischen den Laufstrecken der aufgetrennten Komponenten und Gesamtlaufstrecke der Testsubstanz pro Platte. Rf-Werte ermöglichen es auch Stoffe auf unterschiedlichen Platten miteinander zu vergleichen. Wenn eine Substanz den gleichen Rf-Wert aufweist wie in meinem Fall die Standardprobe, dann ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass es sich um den gleichen Stoff handelt. Dies war auf meinen Platten nie der Fall, es gab höchstens Metaboliten, die in der Nähe von Standardsubstanzen waren. Es sei darauf hingewiesen, dass Kortikosteron per se in dem Lösungsmaterial beider Arten nicht vorhanden war. Kommerzielle Kortikosteron-Messsysteme für Kortikosteron also keine sinnvollen Messwerte liefern können. Auffallend waren Metaboliten in nächster Nähe von Östron-konjugierten Standards. Man kann sagen, dass es sich um Östron-ähnliche Substanzen handelt, dass sowohl Wachteln als auch Hühner

Kortikosteron in Verbindungen umwandeln, die eine ähnliche Polarität wie Östronsulfat aufweisen. Dabei kann es sich potentiell um nicht enzymatisch hydrolysierbare Sulfate oder vielfach hydroxylierte Verbindungen handeln. Für beide Substanzgruppen sind keine Standardsubstanzen kommerziell erhältlich.

Die Rf- Werte der hier untersuchten Proben von Hühnern und Wachteln, sowie jeweils Männchen und Weibchen, waren deutlich unterschiedlich. Demnach stellt man fest, dass Kortikosteron von Männchen und Weibchen beider Arten als unterschiedliche Metaboliten ausgeschieden wird, die jedoch unbekannt bleiben. Auch anhand der TLC- Laufstrecken enthielten sowohl die ersten als auch die zweiten Ausscheidungsmaxima bei Hühnern und Wachteln unterschiedliche Metaboliten, was die angenommene Unterscheidung zwischen Nieren- bzw. Darmweg unterstreicht. Daher sollte man bei Versuchen die Geschlechter in die Validierung mit einbeziehen, da es bei ein und derselben Art innerhalb der Geschlechter Unterschiede geben kann. Die vorliegende Radiometabolismusstudie hat gezeigt, dass Kortikosteron bei beiden Arten als hochpolare Metaboliten ausgeschieden wird. Noch einmal sei betont, dass kein Kortikosteron per se, sondern nur dessen Metaboliten ausgeschieden werden.

3.3. Blinddarmlosung

Bei den Caecumproben habe ich eine wesentlich höhere Anzahl an Banden festgestellt als in den Ausscheidungsmaxima von „normalen“ Lösungsproben. In Blinddarmlosung liegt demnach eine höhere Anzahl von Metaboliten vor. Ebenfalls kann ich zeigen, dass diese Proben eine völlig andere Metaboliten-Zusammensetzung haben. Ein weiteres Problem bei diesen Proben ist, dass man nicht weiß, wie lange und wie variabel diese Proben im Darm verweilen, bevor sie ausgeschieden werden. Somit wird empfohlen Blinddarmmaterial beim Sammeln von Kotproben zu vermeiden.

3.4. Enzymatische und chemische Spaltung

Dekonjugieren der ausgeschiedenen Kortikosteronmetaboliten in Extrakten hat keine Veränderung im Vergleich zu nicht dekonjugiertem Material gebracht. D.h. entweder waren die Metaboliten mit den vorhandenen Methoden nicht spaltbar, oder es sind womöglich gar keine konjugierten Steroide vorhanden gewesen. Die Spaltversuche haben offensichtlich die Metaboliten lediglich auseinander gezogen. Man sieht aber, dass sich die Ausscheidungsmetaboliten von Hühnern und Wachteln unterscheiden.

4. HPLC

In diesem Fall hat die HPLC keine eindeutige Überlappung zwischen Radioaktivität und Immunoreaktivität ergeben. Somit misst keiner der verfügbaren EIA - Antikörper die im Kot vorliegenden Ausscheidungsmetaboliten (Abb. 5 und Abb. 6).

Erster und zweiter Peak haben unterschiedlich hohe dpm Werte, der zweite Peak aber auch einen kleinen Anteil dpm an der Position vom 1. Hauptmetabolit. Das zeigt, dass ein geringer Urinanteil auch im Anteil der Darmausscheidung enthalten ist.

Die Unterschiede der beiden Hühnervogelarten in ihrer Metabolisierung sind beachtlich, was auch die TLC sichtbar gemacht hat. Auch gibt es Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen (Abb. 6a und 6b).

Der von Rettenbacher et al. (2004) für Hühner beschriebene Kortisonassay misst Metaboliten, die auch hier anhand der Radioaktivität bestätigt werden können, jedoch nicht unbedingt den Hauptmetaboliten. Zusammenfassend sei noch darauf hingewiesen, dass obwohl der Kortisonassay bei einer Reihe von Hühnervogelarten als akzeptabel validiert und angewendet wurde (Thiel et al. 2005, Baltic et al. 2005, Arlettaz et al. 2007), kann man ihn nicht bei allen Hühnervogelarten anwenden. Das heißt man muss bei jeder neuen Art mit einer Validierung beginnen.

Verwendete Literatur:

Arlettaz, R., Patthey, P., Baltic, M., Leu, T., Schaub, M., Palme, R. & Jenni-Eiermann, S. (2007):

Spreading free-riding snow sports represent a novel serious threat for wildlife. Proc. R. Soc. B, doi: 10.1098/rspb.2006.0434, published online.

Baltic, M., Jenni-Eiermann, S., Arlettaz, R., Palme, R., 2005. A noninvasive technique to evaluate human-generated stress in the black grouse. Ann. NY Acad. Sci. 1046, 1 - 15.

Buchanan, K. L. & Goldsmith, A. R. (2004): Noninvasive endocrine data for behavioural studies: the importance of validation. Anim. Behav. 67, 183-185.

Dittami, J. P. (1981): Seasonal changes in the behaviour and plasma titers of various hormones in barheaded geese, *Anser indicus*. Z. Tierpsychol. 55, 289-324.

Goymann, W., 2005. On the importance of biological validations: lessons from stonechats and spotted hyenas. Ann. NY Acad. Sci. 1046, 35-53.

Hirschenhauser, K., Möstl, E. & Kotrschal, K. (2005): A synthesis of fecal steroid measurements in Greylag geese (*Anser anser*). Ann. NY Acad. Sci. 1046, 138-153.

Klasing, K.C., 2005. Potential impact of nutritional strategy on non-invasive measurements of hormones in birds. Ann NY Acad Sci 1046, 5–16.

Palme, R. (2005): Measuring fecal steroids: guidelines for the practical application. Ann. NY Acad. Sci. 1046, 75-80.

Palme, R., Fischer, P., Schildorfer, H. & Ismail, M. N. (1996): Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via feces and urine in domestic livestock. Anim. Reprod. Sci. 43, 43-63.

Rettenbacher, S., Möstl, E., Hackl, R., Ghareeb, R., Palme, R., 2004. Measurement of corticosterone metabolites in chicken droppings. Br. Poult. Sci. 45, 704 - 711.

Thiel, D., Jenni-Eiermann, S., Palme, R., 2005. Measuring corticosterone metabolites in droppings of capercaillies (*Tetrao urogallus*). Ann. NY. Acad. Sci. 1046, 1 - 13.

Touma, C., Sachser, N., Möstl, E. & Palme, R. (2003): Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *Gen. Comp. Endocrinol.* 130, 267-278.

Legenden:

Abb. 1: Dünnschichtchromatographieplatte mit aufgetragenen Proben einer männlichen Wachtel nach der Radioaktivitätsmessung im β -Strahlungsmessgerät. Auf jede Platte wurden auch Kontrollpunkte einer Standardprobe mit bekannter Zusammensetzung zum Vergleich aufgetragen. Die Standardprobe enthielt von unten nach oben auf jeder Platte Kortikosteron, Progesteron, Östronsulfat, Cortisol und Östronglucuronid. Die Standardprobe wurde am linken Rand, in der Mitte und am rechten Rand der Platte aufgetragen, dazwischen wurden immer sechs Extrakte der Kotproben aufgetragen.

Abb. 2 Weibliche Wachtel, Details siehe Abb. 1

Abb. 3: Haushahn, Details siehe Abb. 1

Abb. 4: Haushenne, Details siehe Abb. 1

Abb. 5a u. 5b: Auftrennung der ausgeschiedenen Kortikosteronmetaboliten durch HPLC (a) bei Hühnern, (b) bei Wachteln. Die Pfeile in 5a zeigen ungefähr den Kortisonassay von Rettenbacher et al. (2004). THK steht für Tetrahydrokortikosteron. Dpm bedeutet decay per minute/ radioaktiver Zerfall pro Minute. Es zeigt sich, dass sich weder mit Kortison noch mit Tetrahydrokortikosteron Überlappungen zwischen Radioaktivität und Immunoraktivität ergeben haben. Minimale Abweichungen bedeuten bereits, dass es sich um eine andere Substanz handelt.

Probe 41 und 378 sind Proben von ersten Ausscheidungsmaxima, Probe 162 und 267 sind Proben vom zweiten Ausscheidungsmaxima.

Abb. 6a u. 6b: Unterschied der Metabolisierung zwischen erstem und zweiten Ausscheidungsmaximum der Geschlechter bei Hühnern und Wachteln. Minimale Abweichungen bedeuten, dass es sich um einen anderen Metabolit handelt.

TLC-Abbildungen

Abb. 1: Männliche Wachtel

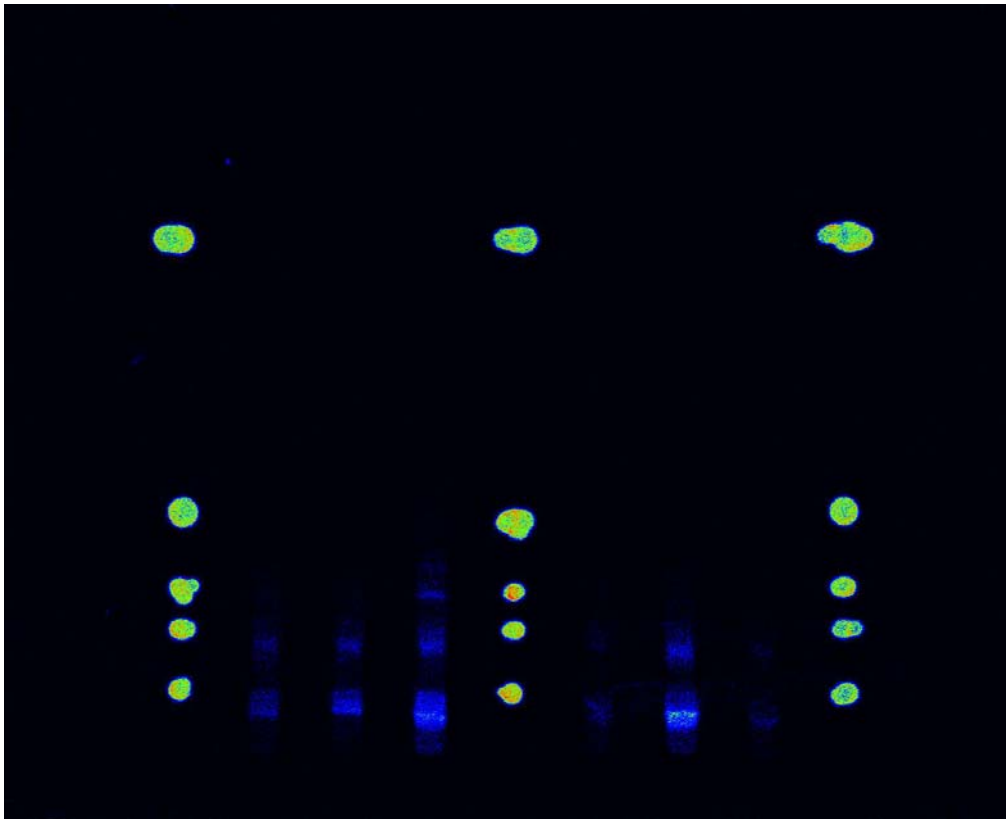


Abb. 2: Weibliche Wachtel

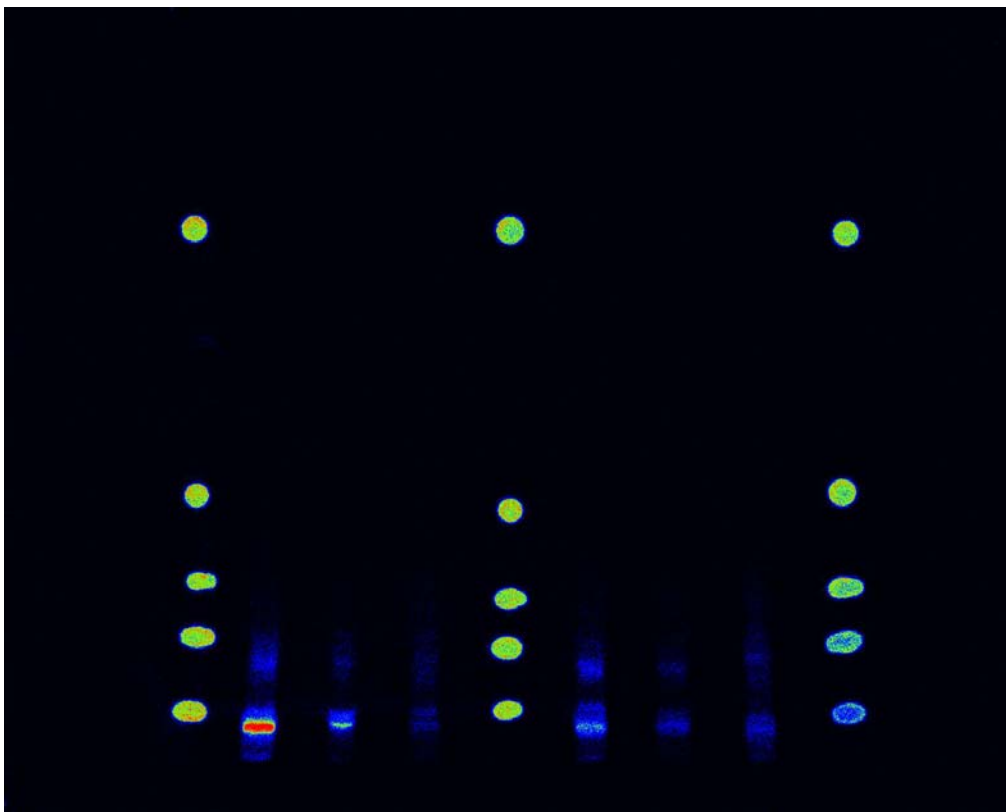


Abb. 3: Haushahn

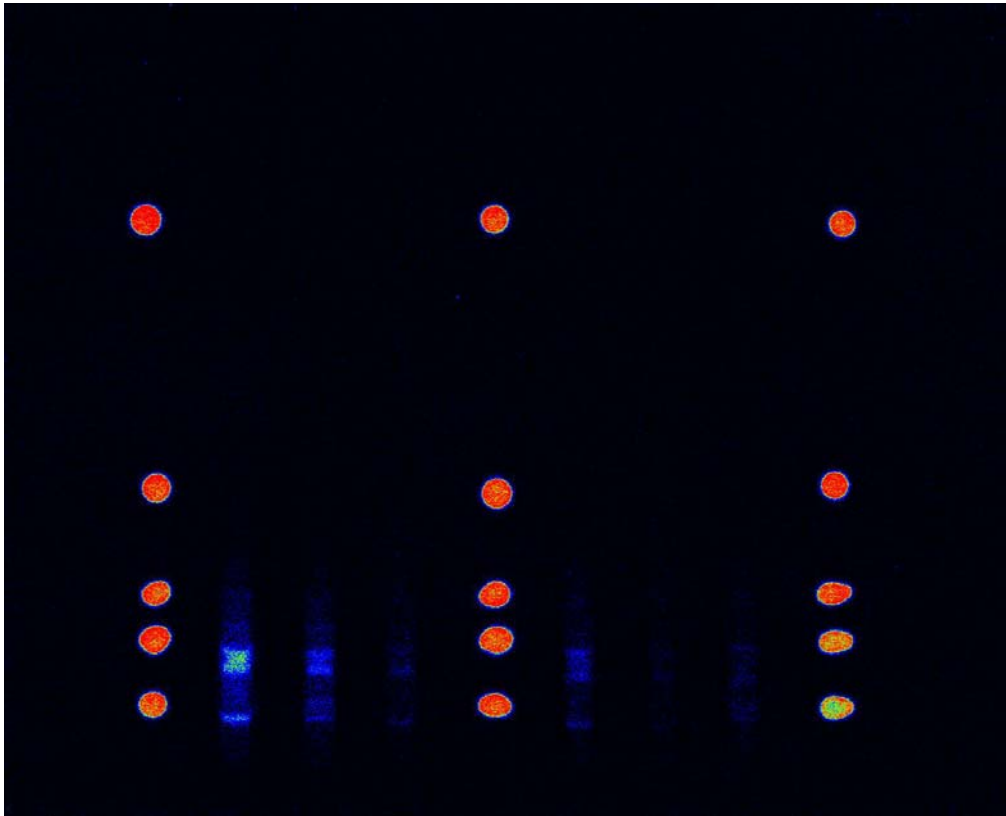


Abb. 4: Haushenne

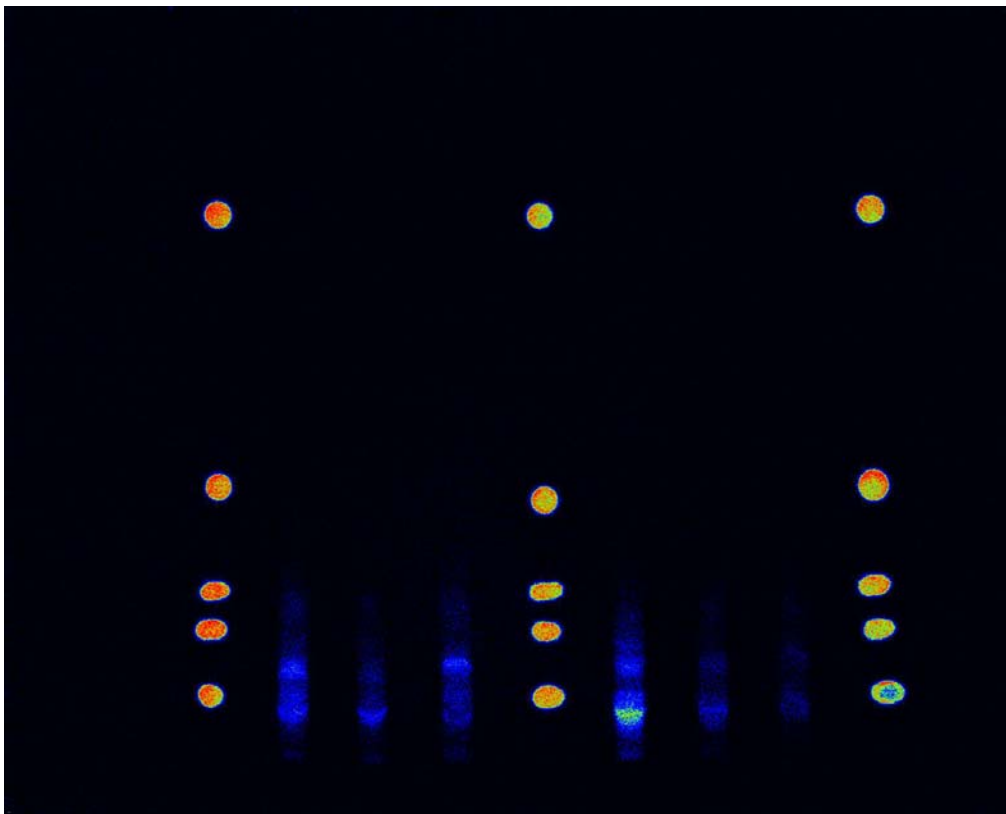


Abb. 5a: HPLC - Ergebnisse

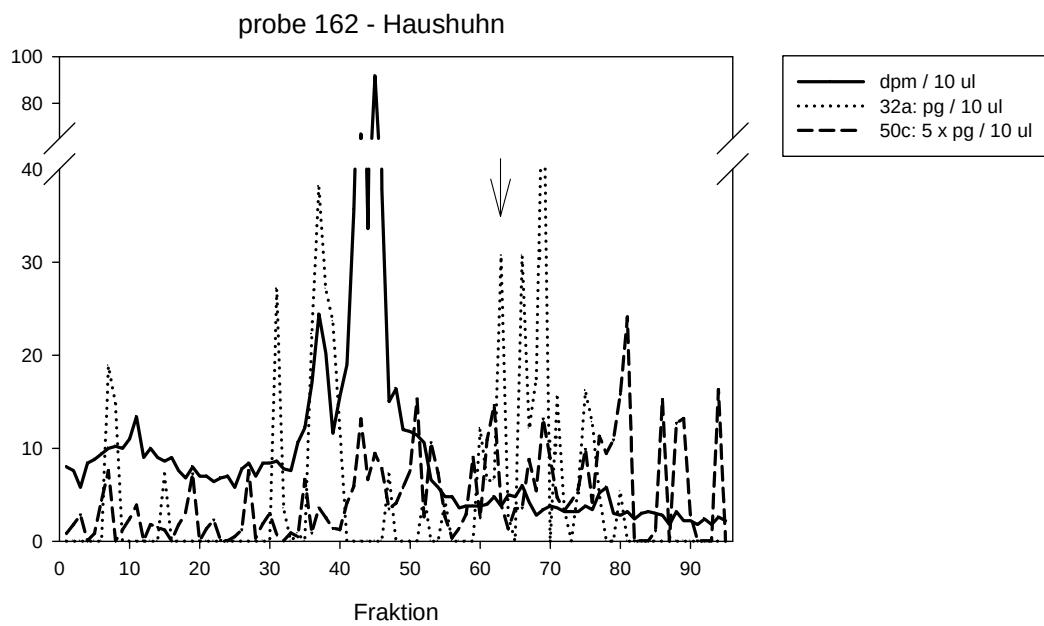
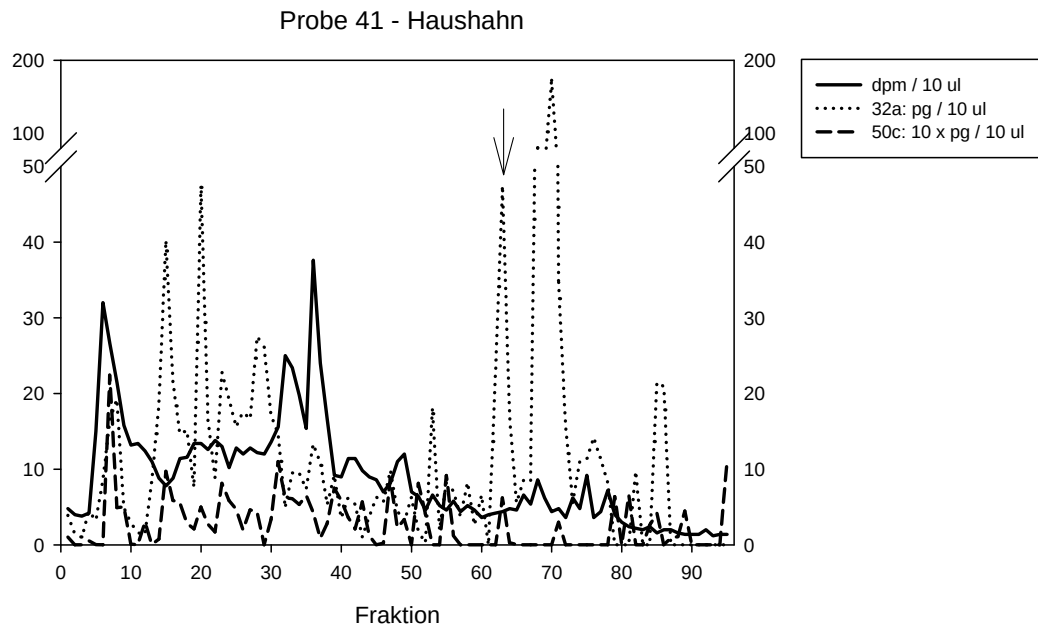


Abb. 5b: HPLC Ergebnisse

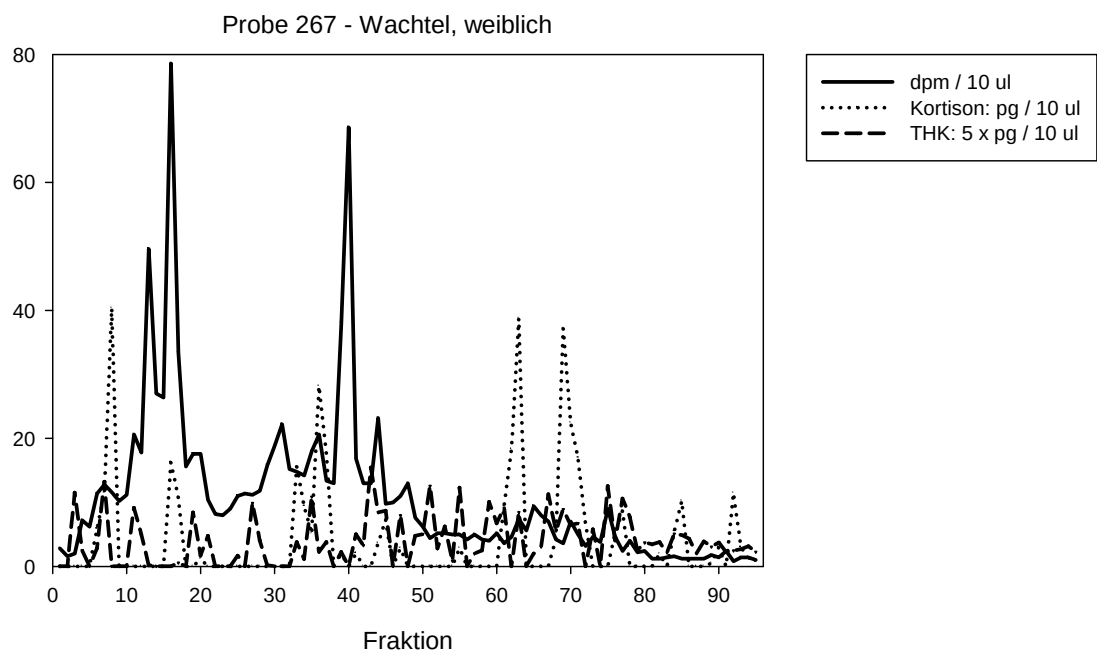
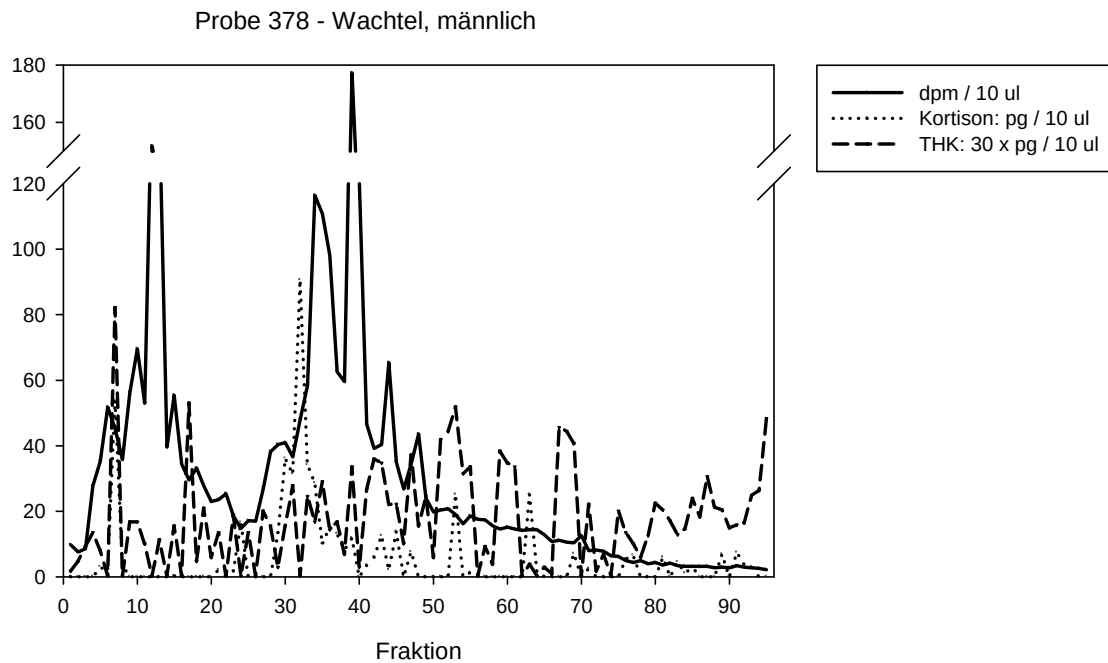


Abb. 6a:

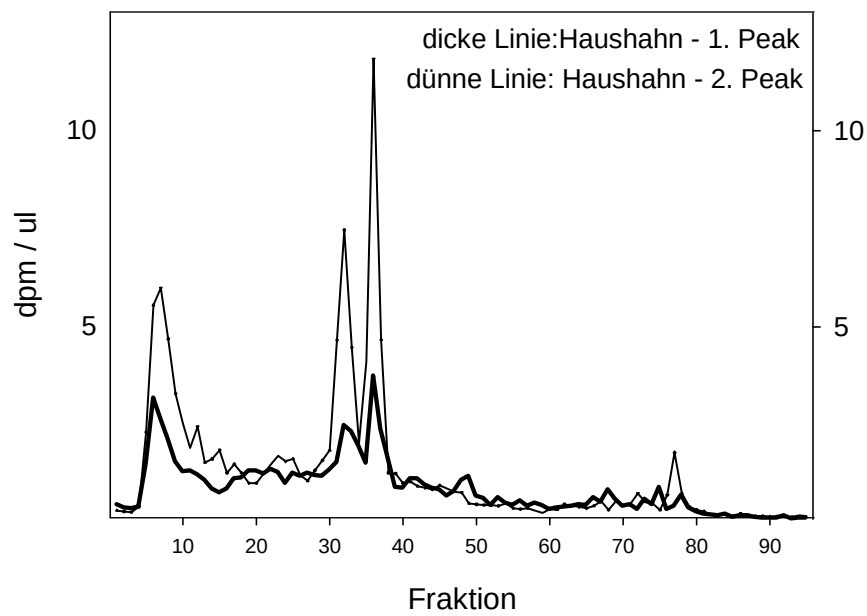
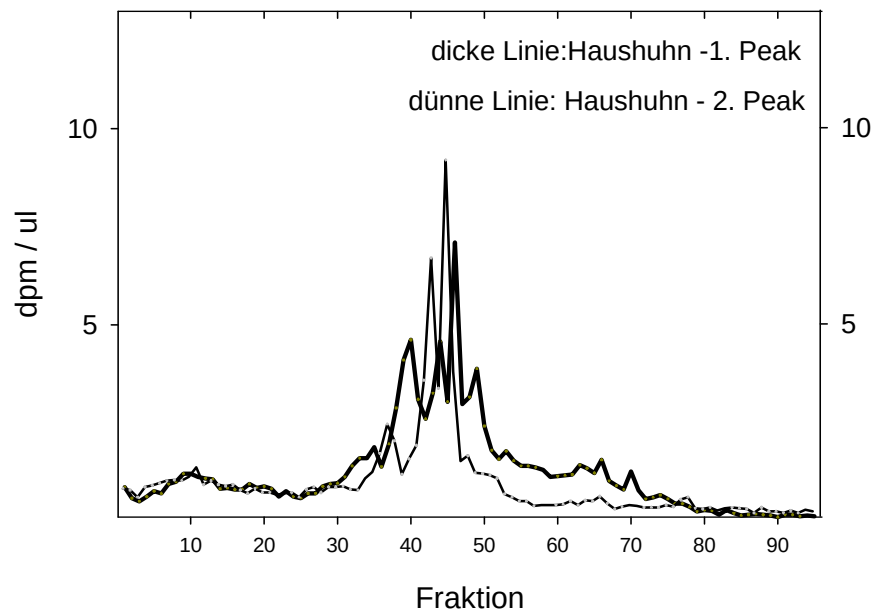
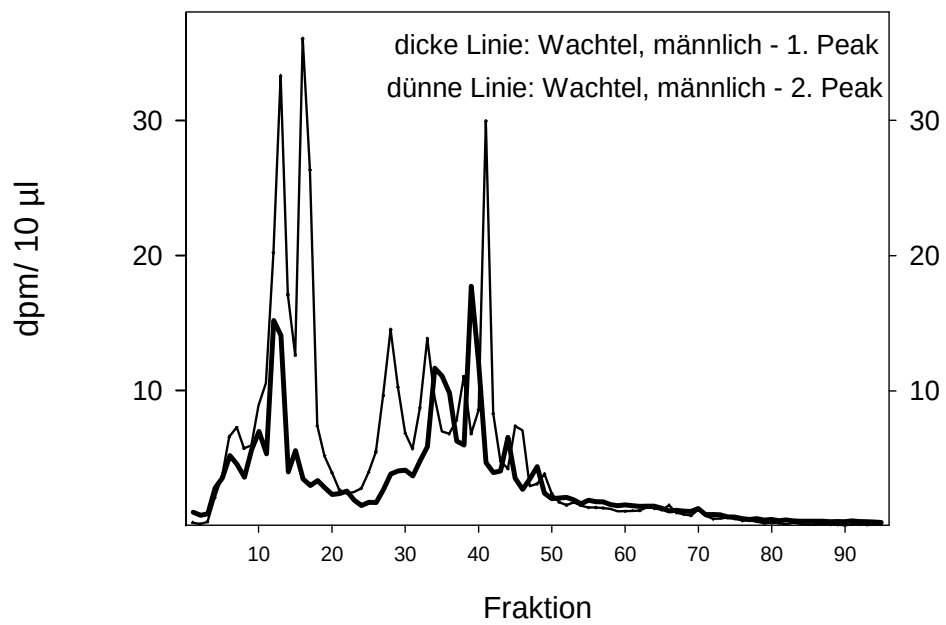
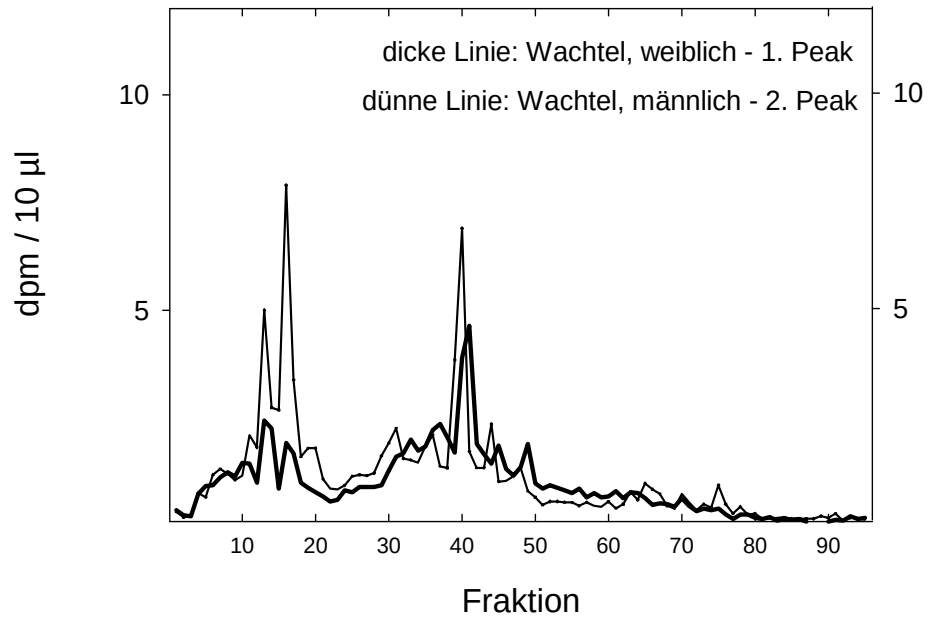


Abb. 6b:



Auszug:

Wachteln (*Coturnix japonica*) eignen sich durch ihre schnelle Generationsfolge und ihre kleine Größe sehr gut als Labortiere. Die Messung der Ausscheidungsmetaboliten von Kortikosteron erwies sich jedoch, im Gegensatz zum Haushuhn, als bisher nicht durchführbar. Ziel dieser Diplomarbeit war es, Ausscheidungsverlauf und Eigenschaften von Kortikosteronmetaboliten im Kot von zwei Hühnervogelarten, den Wachteln und den Hühnern (*Gallus gallus domesticus*) darzustellen. Kortikosteron gehört zu den Glukokortikoiden, das sind Nebennierenrindenhormone, deren Konzentration bei Belastung ansteigt um zusätzliche Energien zu mobilisieren.

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie und radioaktiven Markern die Ausscheidungsmetaboliten von Kortikosteron bei Hühnern und Wachteln analysiert. Kortikosteron wurde zwar injiziert, aber selber in den Losungen nicht wieder gefunden.

Zusätzlich wurden Blinddarmlosungen gesammelt, um deren Zusammensetzungen und die Unterschiede zu den anderen Losungen zu sehen.

Um verschiedene immunreaktive Kortikosteronmetaboliten in den Extrakten der Kotproben zu ermitteln, wurde eine High performance liquid chromatography – Chromatographie (HPLC) an ausgewählten Proben angewandt.

Abstract

Measuring steroid hormone metabolites from droppings is a useful tool for monitoring hormone patterns without handling the birds. The method is particularly helpful in small specimen, for which repeated handling and blood sampling is not feasible. Knowledge about the metabolites in a species' excreta is essential before immunoreactive measurements are interpreted as biologically relevant. We compared the kinetics of excretion and the metabolization of [^3H]-corticosterone in males and females of two galliform species, Japanese quail (*Coturnix japonica*) and domestic fowl (*Gallus gallus* dom.). All animals were injected with [^3H]-labeled corticosterone and droppings were collected during the subsequent 48h (quail) and 24h (fowl). The radioactivity (R) was excreted with two maxima in males and females of both species. Presumably, the first R maximum (30 and 60min, male and female quail; 2 and 1.3h, male and female fowl) came from urine excretion, whereas the second R maximum (180 and 210min, male and female quail; 4.5 and 2.5h, male and female fowl) resulted from both, urine and feces. First and second R maximum samples from each individual were selected for qualitative analyses of excreted metabolites using thin layer chromatography (TLC). TLC separated at least seven radioactive corticosterone metabolites (CM) in the droppings of both species; corticosterone itself was not present in droppings. The quantity and quality of excreted CM varied between the sexes in both species, as well as between quail and fowl. Cecum droppings contained excessively high levels of radioactivity and inconsistent CM compositions and, therefore, should be avoided during dropping collection.

Einen großen Dank für ihre Unterstützung und Hilfestellung
an Katharina Hirschenhauser, Erich Möstl, Michael Lepschy,
Andrea Kuchar und Kurt Kotrschal.

Einen großen Dank an meine Familie und meine Freunde, die
für mich da sind; speziell meinem Bruder Maximilian Josef
Spreitzer, für seine graphischen Fachkenntnisse.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Katharina Spreitzer

Geburtsdatum: 01.11.1980

Staatsbürgerschaft: Österreich

E-Mail: kathi.spr@gmx.at

Bildungsweg

1987 bis 1991 Volksschule in Wien XIII
1991 bis 1999 Bundesrealgymnasium Wenzgasse in Wien XIII
2001 bis 2010 Studium Biologie/Zoologie an der Universität Wien
14.-18.09.2009 Summer school at the Institute for Zoo and Wildlife Research
in Berlin, on non-invasive monitoring of hormones.

Berufserfahrung

03.01.00 bis 30.09.00 Flugbegleiterin bei Austrian Airlines.

01.10.00 bis 30.02.01 Assistentin in einer Steuerberaterkanzlei
bei Mag. Eva Schmidt, Mariahilferstr. 117

Sommer 2001 Ausbildung zur Schilehrerin; Unterricht in den Winterferien

01.04.03 bis 30.03.03 Büroarbeit und Kundenbetreuung im IMAX Wien

01. 07. 04 bis 30.06.07 MA 48, Chemische Mülltrennung für die Stadt Wien

01.07.07 bis heute Mitarbeiterin im Naturhistorischen Museum
Wien in der Säugetiersammlung. Artbestimmung anhand der
Schädelknochen aus Schleiereulengewöllen,
Kleinsäugerpräparation

21.-24.09.2009 Posterpräsentation der Diplomarbeitsergebnisse bei der 7th Conference on
behaviour, physiology and genetics of wildlife in Berlin.

28.08.-09.09-2010 Feldprojekt zur Untersuchung des Lebensraumes von *Microtus bavaricus* im Auftrag
des Landes Tirol und des Naturhistorischen Museums Wien.

24. & 25.09.2010 Posterpräsentation der Diplomarbeit beim KLF Jubiläumssymposium der Universität
Wien, Frontiers in Behavioural Biology.