

Aus dem Department für biomedizinische Wissenschaften der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Physiologie, Pathophysiologie und Biophysik
(LeiterIn: Univ.-Prof. Dr.med. Dr.med.vet. Reinhold Erben)

Minimal invasive Cortisolmessung aus dem Wasser
Ein Pilotversuch bei *Nothobranchius Furzeri*

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von
Felicita Seidl

Wien, im Juli 2020

Interner Betreuer

Ao.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Rupert Palme

Institut für Physiologie, Pathophysiologie und Biophysik, Abteilung für Physiologie, Pathophysiologie und experimentelle Endokrinologie

Externer Betreuer

Dr. med. vet. Roberto Plasenzotti

Medizinische Universität Wien, Abteilung Anna Spiegel Tierhaltung

GutachterIn

Mag.rer.nat. Dr.rer.nat. Kerstin Auer PhD.

Institut für Labortierkunde, Department für biomedizinische Wissenschaften

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	2
1.1 Biologie - Nothobranchius Furzeri.....	2
1.1.8 Haltung N.furzeri -	5
Auszüge aus dem Protokoll nach Genade (2005- Laboratory manual for culturing N.furzeri)	5
1.2 Endokrines System bei Fischen	5
1.2.2 Corticosteroide	6
1.3 Cortisol und die Stressantwort.....	7
1.4 Minimal invasive Cortisolmessungen von Steroiden bei Fischen	8
1.5 Fragestellung	10
2. Material und Methode	11
2.1 Versuchstiere	11
2.2. Versuchsaufbau	11
2.3 Vorbereitung der Proben (Cartridge Sep-Pak C18 short; Fa. Waters)	14
2.3.1 Aktivierung der Sep-Pak	14
2.3.2 Waschen des Sep-Paks	14
2.3.3 Trocknen 1 des Sep Paks.....	14
2.3.5 Trocknen 2 der Sep-Pak.....	14
2.4. Analyse der Probe (HPLC)	15
3 Ergebnisse.....	16
3.1. Messwerte	16
4 Diskussion	19
5. Zusammenfassung	22
6. Summary	23
7 Tabellen und Abbildungsverzeichnis.....	26
Literaturverzeichnis.....	27

1. Einleitung

1.1 Biologie - *Nothobranchius Furzeri*

Der türkise Prachtgrundkärpfling (*Nothobranchius furzeri*, African turquoise killifish) gehört zu den Zahnkärpflingen (Cyprinodontiformes). Erstmals beschrieben 1971 durch R.A. Jubb (Jubb 1981).



Abbildung 1: adulte *N. furzeri* Männchen.

1.1.2 Lebensdauer der Spezies *Nothobranchius*

Charakteristisch für diesen Fisch ist die Anpassungsfähigkeit an seine Umwelt, die von Regenzeit und Trockenperioden bestimmt werden. Diese Art ist ein „annual fish“, er hat eine gesamte Lebensdauer von sechs bis sieben Monaten in der Wildnis. Der *Nothobranchius furzeri* ist das Wirbeltier mit der kürzesten Lebensdauer in Gefangenschaft, seine Lebensspanne liegt bei sechs bis zehn Monaten (Vrtilek et al. 2018, Jubb 1981).

1.1.3 Habitat

Im Südosten von Simbabwe zieht sich die Grenze zu Mosambik über eine niedrige Wasserscheide zwischen dem Fluss Nuanetsi, einem Nebenfluss des Limpopo, und dem Fluss Lundi, der nach dem Eintritt in den Fluss Sabi zum Save River Mosambiks wird. Auf der simbabwesischen Seite der Grenze zwischen diesen beiden großen Flüssen befindet sich das Gona-re-Zhou Reservat (GRZ) mit einer Fläche von etwa 5.180 m². Die Seehöhe liegt zwischen 300 und 600 Metern und das Klima ist von Oktober bis Februar sehr heiß. Der Niederschlag in den Sommermonaten liegt bei etwa 400 Millimetern pro Jahr (Jubb 1981).

Da in den Monaten April bis September nur wenig Niederschlag fällt, ist der Wasserpegel in den Pfannen von Gona-re-zhou saisonabhängig, wobei einige der Pfannen fünf Monate des Jahres trocken sind und andere während der gesamten Saison trocken bleiben (Jubb 1981). Diese Fischart bevorzugt einen Lebensraum mit weichem Substrat sowie einen hohen Trübheitsgrad des Gewässers. Der türkise Prachtgrundkärpfling tritt in den Bereichen wo auch die Pflanze *Nymphaea* sp. vorkommt, vermehrt auf. Die Wassertiefe und die Temperatur sind kein ausschlaggebender Faktor für das Vorkommen des Fisches (Reichard et al. 2009).

Trotz dieser kargen Bedingungen sind aus diesen Pfannen drei Fischarten bekannt: *Protopterus anectens*, der afrikanische Lungenfisch, *Nothobranchius arthonos* und *Nothobranchius furzeri*. Um in Trockenperioden zu überleben, gräbt sich der Lungenfisch in den Schlamm ein und hüllt sich in einen hauchdünnen, plastischen Kokon. Dadurch überlebt der Lungenfisch in der Trockenzeit. *Nothobranchius* hat eine andere Überlebensstrategie: er legt lebensfähige Eier auf dem Grund des aquatischen Lebensraums, bevor das Wasser vertrocknet. Die Eier haben die Fähigkeit in einen Entwicklungszustand einzutreten und in diesem zu bleiben, die sogenannte Diapause oder Eiruhe. Wie die Untersuchungen von Dr. N. Petters und Dr. J.P. Wourms gezeigt haben, ist die Fähigkeit der *Nothobranchius*-Populationen, sowohl zyklisch wiederkehrende Trockenperioden zu überleben, als auch dem Aussterben durch unregelmäßige klimatische Bedingungen zu entkommen, auf die Diapause zurückzuführen (Jubb 1981).

1.1.4 Diapause bei *N. furzeri*

Charakterisiert ist *N. furzeri* durch eine embryonische Diapause II (Wourms 1972), eine Überlebensstrategie für die klimatischen Bedingungen in ihrem Lebensraum (Jubb 1981).

Die Diapause des Prachtgrundkärpflings ist vor allem von der Umgebung in den saisonalen Tümpeln abhängig. Es gibt bei den saisonalen Arten der Nothobranchien Unterschiede: manche Embryonen bleiben in der Diapause II, andere entwickeln sich direkt weiter zu einem erwachsenen Individuum. Die Embryonen, die sich direkt entwickelten, hatten einen höheren Herzschlag und eine schnelle Zunahme des Kopfumfangs im Vergleich zu jenen, die in der Diapause II verbleiben. Auch der Metabolismus derjenigen, die die Diapause auslassen, ist höher als im Vergleich zu den Arten, die eine Diapause durchleben (Furness 2016).

Temperatur und Licht sind Faktoren, die das Eintreten in die Diapause beeinflussen. Bei einer Temperatur um die 20°C gehen fast alle Eier in die Diapause; bei einer Temperatur von 30°C hingegen entwickeln sich fast alle direkt zu erwachsenen Tieren. Das Licht hat hierbei auch einen Einfluss. Ist die Umgebung sehr dunkel, so begeben sich über die Hälfte der Eier in die Starre. Auch bei der Länge der Diapause II hat das Licht Einfluss, denn wenn es dunkler ist, ist die Diapause II auch länger. Weiters ist zu bemerken, dass Embryos, die in Diapause gegangen sind, signifikant länger leben als jene ohne. Bei der Lebensspanne der Tiere zeigte sich auch, dass bei einer höheren Temperatur um die 30°C die Tiere kürzer leben als die bei 25°C (Furness et al. 2015).

1.1.5 Sexueller Dimorphismus

Nothobranchien sind sexuell dimorph und dichromatisch. Männliche Tiere sind bunt, die weiblichen eher zurückhaltend in der Farbgebung (Haas 1976). Diese Knochenfischart zeichnet sich durch einen deutlichen Sexualdimorphismus aus, bei den Männchen erkennt man ab Tag 11 die zunehmende Pigmentation (Blazek et al. 2013). In *N. furzeri* findet man die Farben Rot und Gelb, vor allem an der caudalen Schwanzflosse. Es kommen rote und gelbe Männchen im selben Habitat vor (Reichard et al. 2009). Die rote Farbe ist eher in trübem Wasser sichtbar, das Gelb besser in klaren Gewässern (Litjens et al. 1999). Die männlichen Tiere sind größer als die weiblichen. Allgemein variiert die Größe mit dem Habitat und der Populationsdichte. Bei idealen Bedingungen werden Männchen bis 100 mm groß (Jubb 1981).

1.1.6 Lebenserwartung und Fortpflanzung

Diese Art hat eine sehr kurze Lebenserwartung. *N. furzeri* hat sogar, soweit bekannt, die kürzeste Lebensspanne aller Vertebraten, die im Labor gehalten werden können (Blazek et al. 2013). Der Lebenszyklus ist sehr angepasst an die Umwelt, sobald sich ein Tümpel mit Wasser füllt, beginnen die Fische zu schlüpfen, wachsen schnell und werden geschlechtsreif (Blazek et al. 2013, Polacik et al. 2011). Nothobranchien haben ein polyandroses Fortpflanzungssystem. Männchen und Weibchen wechseln auch Partner zwischen dem Ablaichen (Haas 1976). Männliche Tiere sind immer zur Paarung bereit und suchen aktiv nach Weibchen (Passos et al. 2013). Pro Tag werden 20-50 Eier gelegt, die Anzahl der Eier hängt auch von Ressourcen und Größe des Tieres ab (Blazek et al. 2013). Die Entwicklung des Individuums, von der Eizelle zum geschlechtsreifen Zustand ist sehr rapide. Weibliche Tiere benötigen dafür nur 17 bis 19 Tage, männliche Exemplare erreichen die Geschlechtsreife mit 16 Tagen, manche sogar noch früher. Durch die schnelle Geschlechtsreife ist ein schneller Generationenwechsel gewährleistet (Blazek et al. 2013). Ab dem 21. Tag beginnen die weiblichen Tiere mit der Eiablage und erreicht ihren Höhepunkt etwa um den 42. Tag, danach geht die Produktion wieder etwas zurück. Die höchste Eiablage innerhalb von 2,5h liegt bei 583 Eiern (bei NK430), dies ist aber auch abhängig davon, welche Zuchtlinie verwendet wird. Die Überlebensrate der Embryos hängt unter anderem davon ab, welches Substrat den Tieren für die Eiablage angeboten wird. Berichtet wird, dass eine Überlebensrate bei Torfsubstrat von 73% der Embryos in den ersten 30 Tagen erzielt wird. Die ersten Individuen können nach 15 Tagen Inkubation schlüpfen (Blazek et al. 2013).

Dennoch gibt es Unterschiede in den verschiedenen Stämmen. Der GRZ Stamm hat eine maximale Lebensdauer von vier Monaten, wohingegen der MZM Stamm acht bis zehn Monate lebt (Hartmann et al. 2013).

1.1.7 Ernährung

Der türkise Prachtgrundkärpfling ernährt sich hauptsächlich von Makroinvertebraten und richtet sich nach der Beute, die in den Tümpeln verfügbar ist. Beschrieben werden pelagische und benthische Beute (Polacik und Reichard 2010). Favorisiert werden kleine Crustaceaen (Cladocera, Copepoda, Ostracoda und Conchostraca) (Polacik und Reichard 2010). Kannibalismus in der freien Wildbahn wird nicht beschrieben (Polacik et al. 2011).

1.1.8 Haltung *N. furzeri* - Auszüge aus dem Protokoll nach Genade (2005- Laboratory manual for culturing *N. furzeri*)

Das Protokoll nach Genade (2005) wird international für die Haltung von *N. furzeri* angewendet. Für 10-15 adulte Tiere mit einer Größe von 4-8 cm benötigt man ca. einen 30 l Tank. Mit der Besatzdichte sollte auch die Wasserqualität steigen. Wenn man gewährleisten kann, dass täglich 10-20 % des Wassers ausgetauscht werden, ist eine Filtration nicht notwendig. Falls nicht möglich, kann das auch mit einem Filter, der Luftblasen produziert, erreicht werden. Die Temperatur sollte um die 25.0°C liegen. Käfigausgestaltung ist nicht unbedingt notwendig, für gestresste Tiere kann man zum Verstecken Javamoos hinzufügen. Ein pH Wert von 6-8 ist ideal; ein rapider Wechsel sollte vermieden werden.

1.2 Endokrines System bei Fischen

Das endokrine System ist ein chemisches Informationsnetzwerk, das aus verschiedenen Drüsen besteht. Diese produzieren chemische Botenstoffe die sogenannten Hormone.

Hormone sind wichtige Regulatoren in fast allen Bereichen im Leben der Wirbeltiere wie Metabolismus, Wachstum, Fortpflanzung und Entwicklung (Bern 2015, Bern 1990).

In dieser Arbeit wird genauer auf das Hormon Cortisol eingegangen. Cortisol ist die durch Oxidation inaktivierte Form des Glucocorticoids Cortisol (Ostrander 2000).

Da die Knochenfische (Teleostei) 95% aller Fischarten repräsentieren, fokussieren sich die Forschungen über das endokrine System, auch auf diese Arten. Ein weiterer Grund ist, dass Knochenfische vor allem für Forschung in Laboren verwendet werden (Ostrander, 2000).

Die Methoden, um das endokrine System von Fischen zu verstehen, haben sich in den letzten Jahren weiterentwickelt. So sind Radioimmunoassay (RIA), Enzymimmunoassay (EIA) und high performance liquid chromatography (HPLC) wichtige Instrumente für die endokrine Forschung geworden. Einige Forschungsergebnisse und Methoden von Säugetieren können auch auf Fische angewandt werden. Zum Beispiel sind Katecholamine und Thyroidhormone, bei allen Vertebraten gleich, sowie die meisten der Steroidhormone. Die Steroidhormone werden über den gleichen Weg synthetisiert wie bei Säugern (Ostrander, 2000).

1.2.1 Anatomie der endokrinen Drüsen bei Fischen

Teleost Fische haben kaudale neurosekretorische Neuronen die sogenannte Urophyse, die Urotensine sezerniert, die bei der Osmoregulation helfen. Bei Fischen fehlt eine organisierte Nebenniere. Es gibt interrenales Gewebe, das sich hauptsächlich in der vorderen (Kopf-)Nierenregion befindet. Dieses sezerniert Corticosteroide. Die Adenohypophyse (vordere Hirnanhangdrüse) bekommt die stimulierende Neuropeptide des Hypothalamus direkt über Neuronen. Die primäre Stressantwort bei Fischen ist die Freisetzung von Corticosteroiden bei Stimulation der Hirn-Hypophyse-Interrenaln Achse zusammen mit den Katecholaminen der Hirnsympathischen chromaffinen Zellen (Eales und Maclatchy 1989, Ostrander 2000).

1.2.2 Corticosteroide

Cortisol ist das Corticosteroid das bei Teleosten am meisten mit ca. 80 % zirkuliert. Das interrenale Gewebe der Plattenkiemer setzt ein Corticosteroid frei, 1 α -Hydroxycorticosteron. Cortisol wird sezerniert durch die primäre Antwort auf das adrenocorticotrope Hormon (ACTH), obwohl auch α -MSH, atrialer natriuretischer Faktor, Urotensine, Angiotensine II, Wachstumshormone, Thyroxin, Arginin Vasotocin und Katecholamine eine corticoide Wirkung haben (Wendelaar Bonga 1997, Ostrander 2000). Anders als bei Säugetieren hat Cortisol bei Knochenfischen beide Funktionen für Glucocorticoide und Mineralcorticoide. Das erste Zielgewebe von Cortisol sind die Kiemen, Leber und intestinale Epithelien. Cortisol aktiviert viele wichtige Enzyme, die den intermediären Metabolismus der Leber kontrollieren (Vijayan et al. 1991). Es stimuliert auch die Glycolyse und Gluconeogenese von Proteinen und Lipiden. Die Funktionen von Mineralocorticoiden sind wichtig für Wasser- und Ionenbalance. Diese agieren gemeinsam mit Hormonen wie Prolactin bei Süßwasserfischen und Wachstumshormone bei Salzwasserfischen. Das Cortisollevel ändert sich auch wenn Süßwasserfische in salziges Wasser umgesetzt werden, sowie Salzwasserfische in Süßwasser (Avella et al. 1987, Laurent und Perry 1990, Ostrander 2000).

Auf zellulärer Ebene ist die Proliferation der branchialen Chlorid Zellen, die durch Cortisol stimuliert werden, für die hydrominerales Balance verantwortlich. Auch Na⁺/K⁺-ATPase in den Kiemen, Darm und den Nieren tragen zum Gleichgewicht bei (Ostrander 2000, Kenyon et al. 1980, McCormick 1995).

1.3 Cortisol und die Stressantwort

Eine Erhöhung des Plasmacortisollevels ist ein oft verwendeter Indikator für eine Stressantwort. Dieses Hormon wird bei Fischen häufig gemessen (Ostrander 2000). Die Ruheplasmakonzentration von Cortisol reicht von nur 5 ng/ml für Salmoniden bis zu 10 bis 50 ng/ml bei anderen Teleosteen (Ostrander, 2000). Die Stressantwort kommt schnell und innerhalb von zehn Minuten treten erhöhte Cortisolspiegel im Blutkreislauf auf (Sumpter et al. 1986). Es gibt Unterschiede in den Cortisolspitzen, die mit dem Metabolismus in Zusammenhang zu stehen scheinen. Salmoniden weisen mit 400-600 ng/ml die größten Erhöhungen des Plasma-Cortisolspiegels auf, während weniger aktive Spezies Werte zwischen 50 und 200 ng/ml aufweisen (Ostrander 2000). Der Cortisolspiegel weist natürliche Schwankungen auf, die mit Tages- und Saisonzyklen, der endgültigen Reifung, dem Laichen und dem Ernährungszustand zusammenhängen (Wendelaar Bonga 1997).

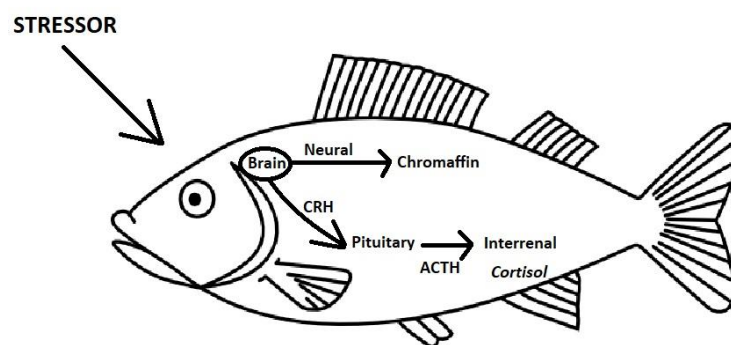


Abbildung 2: Schematische Darstellung: Stressantwort Cortisol (aus Schreck, 2016).

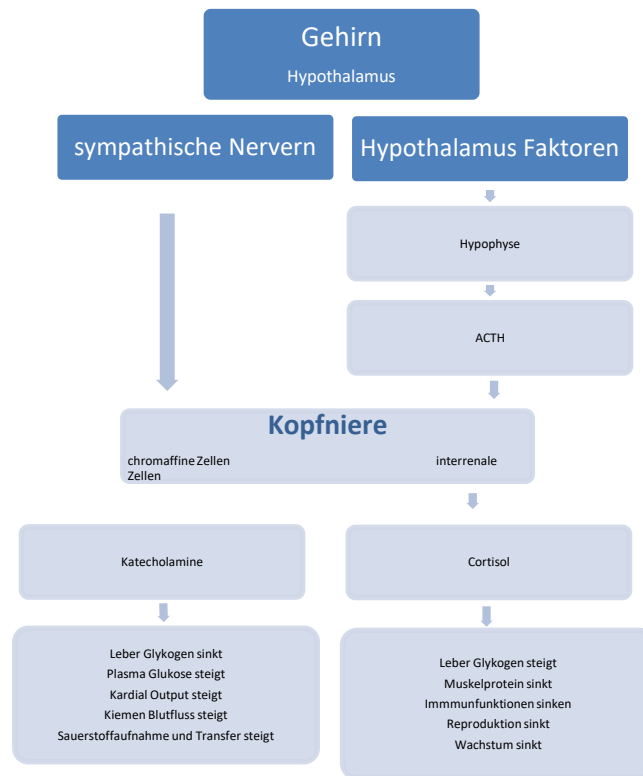


Abbildung 3: Stressantwort nach Ostrander (2000).

1.4 Minimal invasive Cortisolmessungen von Steroiden bei Fischen

Fische empfinden Handling als Stress, das Nervensystem nimmt die Gefahr wahr und Adrenalin wird in die Blutbahn abgegeben, darauf wird das Hormon Cortisol ausgeschüttet (Mazeaud et al. 1977). Gerade bei Fischen ist eine direkte Messung z.B. durch eine Blutabnahme sehr stressig, noch belastender als bei anderen höheren Wirbeltieren, denn jede Blutabnahme ist mit einem Entfernen des Fisches aus dem Wasser verbunden (Ellis et al. 2013).

1.4.1 Messung von Steroidhormonen und deren Weg ins Wasser

Die Konzentration von Steroiden im Wasser wird beeinflusst von der Biomasse des Fisches, die Dauer der Freisetzung und die Verdünnung in das Wasser. Es gibt verschiedene Möglichkeiten um Hormone bei Fischen zu messen, Steroide sind sowohl im Blut, Schleim, Kot und Urin, als auch im umgebenden Wasser detektierbar. Die Probengewinnung von Mucus ist immer mit fangen, Handling und Abtragen des Schleimes verbunden und somit stressig für die Tiere. Es wird angenommen, dass Mucus bei Fischen kontinuierlich produziert wird, dadurch

ist es wahrscheinlich, dass die Steroide im Wasser die momentane Hormonproduktion darstellen. Man unterscheidet zwischen gebundenen und freien Steroiden, für die Detektierung von freien Steroiden aus dem umgebenden Wasser gelangen die Hormone hauptsächlich über die gut durchblutenden Kiemen in das Wasser, aber in geringerer Menge auch durch Urin und Kot), die in das Wasser abgegeben werden. Auch direkt aus dem Kot lassen sich Steroide messen. Das Sammeln von Faeces kann aufwändig sein, auch die Konsistenz, Wärme, Trübungsgrad, Menge des Kots und Futtermenge spielen eine wichtige Rolle. Urin ist eine weitere Möglichkeit wo Steroide detektierbar sind. Es gibt auch Unterschiede in den Messungen je nachdem ob die Tiere in Salz oder in Süßwasser leben (Ellis et al. 2013).

Die Messung von Steroidhormonen aus dem Blut ist vor allem bei kleineren Tieren schwierig, da die Menge des Plasmas sehr klein ist, bei Zebrafischen unter 5 µl (Felix et al. 2013). Um die Steroidhormone zu messen, bedarf es besonders bei Messungen aus dem Wasser bestimmter Messmethoden. Steroidhormone werden typischerweise entweder mittels Radioimmunoassay oder Enzymimmunoassay in Plasma oder Gewebehomogenaten gemessen (Pottinger 2008).

Es kann zu Verunreinigungen kommen wenn keine Handschuhe verwendet werden, da sich Steroide auf der menschlichen Haut befinden (Ellis et al. 2013).

1.4.2 Extraktionsmethode (Beispiel bei Zebrafish *Danio rerio*)

Grundsätzlich verwendet man zur Messung von Steroidhormonen aus dem Wasser Enzymimmunoassays (EIA). Wasserproben werden gefiltert, um grobe Partikel wie Kot oder Futterreste zu entfernen. Um die Steroide zu konzentrieren werden „C18 extraction cartridges“ verwendet. Diese werden mit absolutem Methanol aktiviert und mit destilliertem Wasser durchgespült, anschließend wird die Probe appliziert und am Schluss mit Vakuum-Pumpen getrocknet. Diese Schritte sind essenziell, um die Proben analysieren zu können. Anschließend werden die Proben bei -20°C gefroren. Zur Probenanalyse werden die Cartridges bei Raumtemperatur aufgetaut und dann mit Ethanol die Steroide von den Säulchen eluiert, dann verdampft das Ethanol. Anschließend wird destilliertes Wasser und Diethyläther zugefügt und für ca. 20 min geschüttelt. Für die Phase der Separation werden die Proben zentrifugiert und bei -80°C für 20 min eingefroren. Die organische Phase wird in ein Glasfläschchen umgefüllt und die Ätherextraktion ein zweites Mal wiederholt, um eine höhere Extraktionsausbeute zu erzielen. Das fi-

nale Volumen Äther wird im Speed-Vac abgedampft. Die organische Phase, die die unkonjugierte Steroidfraktion enthält, wird mit 1 ml der Pufferlösung für den EIA rekonstituiert (Felix et al. 2013).

1.5 Fragestellung

Diese Studie beschäftigt sich mit der Frage ob und wie das Stresshormon Cortisol minimal invasiv aus dem Wasser mit *N. furzeri* gemessen werden kann. Hierbei geht es um eine Machbarkeitsstudie, die sich damit befasst, ob eine solche Methode bei dem kleinen Fisch möglich ist und ob es sich tatsächlich um das Steroid Cortisol oder seine Metaboliten handelt. Es sollte auch überprüft werden, ob die Messmethode mittels HPLC und EIA für diesen Versuch richtig gewählt ist. Da es eine Spezies ist, die territorial agiert (Dodzian et al. 2018), ist meine Hypothese, dass die Fische, die sich sehen können, gestresster sind als Tiere, die sich nicht sehen können.

2. Material und Methode

2.1 Versuchstiere

Alle verwendeten Tiere in diesem Pilotversuch wurden in der Fischkolonie der Medizinischen Universität Wien aufgezogen. Für den Versuch (Ethikbescheid siehe Seite 25) wurden fünf männliche Tiere der Spezies *Nothobranchius furzeri* aus dem GRZ Strain Generation 159 verwendet. Die Tiere waren zum Versuchszeitpunkt 11,5 Wochen alt. Die Wartungs- und Zuchtbedingungen wurden nach dem Protokoll (Genade et al. 2005) durchgeführt. Die Fische wurden in einem maßgeschneiderten Überlaufsystem gezüchtet, zweimal täglich mit lebenden oder gefroren roten Blutwürmern gefüttert und in einem 12-stündigen Hell/Dunkel-Zyklus mit einer Fischdichte von einem Fisch pro 2,8 l Tank bei 27° C gehalten (Zupkovitz et al. 2018).

2.2. Versuchsaufbau

Am 12.09.2019 um 11.20 startete der Pilotversuch.



Abbildung 4: von links nach rechts: 1 Fisch mit Sichtschutz, 2 Fische einzeln im Tank ohne Sichtschutz, 2 Fische mit Sichtschutz gemeinsam im Tank.

Die Fische wurden aus ihrem gewohnten Behälter in einen anderen für den Versuch gesetzt, damit die Chance erhöht wird, das Cortisol zu detektieren. Das Ziel war es Cortisol im Wasser zu messen. Daher wurden die Tiere einem Stressor ausgesetzt. Manche Tiere hatten einen Sichtschutz und andere nicht.

Jeder Fisch hatte für die Zeit des Versuches also für fünf Stunden 0,5 L zur Verfügung, bei dem Tank mit zwei Fischen war 1 L im Tank. Das Wasser stammt aus dem hauseigenen Overflow-system. Die Wasserproben wurden jeweils aus den Tanks der Fische genommen. Nach Ablauf der 5 Stunden wurden die Fische nach dem Versuch wieder in ihren gewohnten Behälter gesetzt.



Abbildung 5: 1 Männlicher Fisch mit Sichtschutz (0,5 L)



Abbildung 6: 2 männliche Fische im separaten Tank ohne Sichtschutz 0,5 L jeweils.

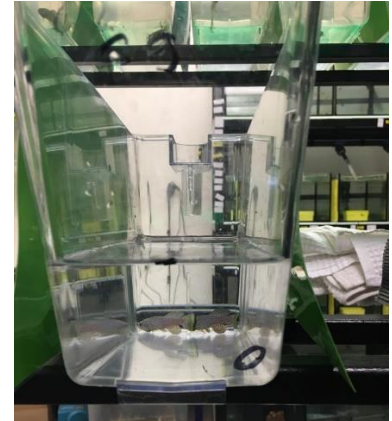


Abbildung 7: 2 männliche Fische gemeinsam in einem Tank mit 1 L mit Sichtschutz.

Insgesamt wurden fünf Proben genommen: ein männliches Exemplar mit Sichtschutz, einer ohne Sichtschutz und zwei Exemplare im selben Tank und eine Probe als Negativkontrolle aus dem frischen aufbereiteten Tankwasser. Probe 3 wurde in 3A und 3B geteilt, da für die Probenapplikation immer nur 0,5 L durch die Kartusche (Cartridge Sep-Pak C18 short) fließen sollten, aber sich in dem Tank 2 Tiere befanden.

Der Versuch startete um 11.20 Uhr und endete mit der Wasserentnahme um 16.30 Uhr. Die Probenaufarbeitung, inklusive Aktivierung des Filters, dauerte von 17.00 bis 20.00. Eine Probe aufzubereiten dauerte ca. 30 min.



Abbildung 8: Wasserentnahme um 16.30 von 5 Proben.



Abbildung 9: Stationen für Probenaufarbeitung, 1: Methanol, 2: Destilliertes Wasser, 3: Wasser entfernen (trocknen), 4: Probenapplikation, 5: Wasser entfernen.

2.3 Vorbereitung der Proben (Cartridge Sep-Pak C18 short; Fa. Waters)

2.3.1 Aktivierung der Sep-Pak

- 1) Achtung auf die Flussrichtung. Es muss jede Flüssigkeit vom kurzen Ende der Sep-Pak zugeführt werden, das ist auch wichtig für die Bearbeitung im Labor mit der HPLC
- 2) 5 ml Spritze mit 100% Methanol füllen
- 3) Sep-Pak mit kurzem Ende auf die Spritze stecken
- 4) Maximal in Tropfgeschwindigkeit durch den Filter drücken
- 5) Der Alkohol wird verworfen



Abbildung 10: Spritze mit Cartridge Sep-Pak C18

2.3.2 Waschen des Sep-Paks

- 1) 10 ml destilliertes H₂O in eine Spritze füllen
- 2) Sep-Pak mit kurzem Ende auf Spritze stecken
- 3) Maximal in Tropfgeschwindigkeit durch den Filter drücken



Abbildung 11: Rollerquetschpumpe von Stöckert Instrumente München, Typ: 10-10-00; Fabriknummer: 10H 1496; 220 V ;50 Hz; 1,5 A

2.3.3 Trocknen 1 des Sep Paks

- 1) Trocknen ist sehr wichtig, da durch restliches Wasser die Probe verfälscht werden könnte
- 2) Aufstecken einer leeren 10 ml Spritze
- 3) 4-5 Mal Luft durch den Filter drücken
- 4) Säule bereit die Probe zu binden

2.3.4 Applizieren der Probe

- 1) 0,5 L der Wasserprobe
- 2) Sep-Pak mit kurzem Ende auf Spritze stecken
- 3) Maximal in Tropfgeschwindigkeit durch die Säule mit einer Rollenquetschpumpe laufen lassen mit
- 4) 2 UPM (Umdrehungen pro Minute)



Abbildung 12: Probenapplikation mit Rollenquetschpumpe

2.3.5 Trocknen 2 der Sep-Pak

- 1) Trocknungsschritt sehr wichtig, da durch restliches Wasser die Probe verfälscht werden könnte
- 2) Aufstecken einer leeren 10 ml Spritze
- 3) 4-5 Mal Luft durch den Filter drücken

4) Probe bereit zum Einfrieren

2.4. Analyse der Probe (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, ist eine leistungsfähige chromatographische Trennmethode, diese separiert Stoffgemische auf einer festen stationären Phase mit Hilfe einer flüssigen mobilen Phase unter hohem Druck. HPLC basiert auf unterschiedlichen Elutionen der in einem Stoffgemisch enthaltenen Komponenten. Je stärker die Aufnahme der zu trennenden Stoffe zur stationären Phase (Säule) ist, umso länger bleiben sie in der Säule (Lindsay et al. 1992). Die Proben wurden mittels HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie) aufgetrennt und fraktioniert. In den einzelnen Fraktionen wurde Cortisol mittels Enzymimmunoassay (Palme et al. 1997) im Labor der Abteilung für Physiologie, Pathophysiologie und experimentelle Endokrinologie der Veterinärmedizinischen Universität gemessen. Die Proben waren 15 Tage eingefroren. Die Probe (0,5 L) wurde in Sep-Pack C18 short (Fa. Waters) gebunden und die Steroide mit 5 ml Methanol eluiert. Schließlich wurde die Probe eingedampft und in 220 µl 40% Methanol aufgenommen. Anschließend wurden davon 200 µl in die HPLC injiziert.

3 Ergebnisse

3.1. Messwerte

In Tabelle 1 und im Säulendiagramm (Abbildung 13) sind die Ergebnisse des Pilotversuches dargestellt. In der Tabelle werden die Ergebnisse des Versuches tabellarisch dargestellt. Die Konzentration der Proben wurden in pg pro Well und pg pro halben Liter berechnet. Es wurden insgesamt 5 Proben bearbeitet. Probe 3 wurde aufgeteilt da zwei Fische im selben Tank waren. Bei Probe 4 handelt es sich um die Negativprobe. Die Endergebnisse wurden in Summe der Fraktionen in pg, in ng pro halben Liter und pg pro Milliliter angegeben.

Tabelle 1: *Ergebnisse Cortisol EIA*

Fraktion	Probe 1 pg/Well	pg/0,5 L	Probe 2 pg/Well	pg/0,5 L	Probe 3A pg/Well	pg/0,5 L	Probe 3B pg/Well	pg/0,5 L	Probe4 pg/Well
30	13,3	107	15,9	127	30,3	242	9,2	74	0,0
31	37,0	296	31,1	249	75,1	601	24,8	198	0,0
32	99,9	799	52,9	423	99,9	799	37,0	296	0,0
33	98,7	790	24,0	192	98,7	790	16,1	129	0,0
34	80,0	640	22,7	182	44,1	352	99,9	799	0,0
35	44,1	352	62,6	501	61,1	489	77,5	620	0,0
36	10,3	82	29,4	235	29,2	233	88,6	709	0,0
37	16,8	135	8,7	69	68,5	548	61,1	489	0,0
38	3,5	28	2,3	18	19,0	152	10,8	87	0,0
39	3,0	24	0,3	2	6,0	48	5,7	46	0,0
SUMME der Frakti- onen (pg) - in Teil der Fraktionen gemessen	407	3253	250	1999	532	4255	431	3446	0,0
ng/0,5 L	3,3		2,0		4,3		3,4		0,0
pg/ml Wasser	6,5		4,0		8,5		6,9		0,0

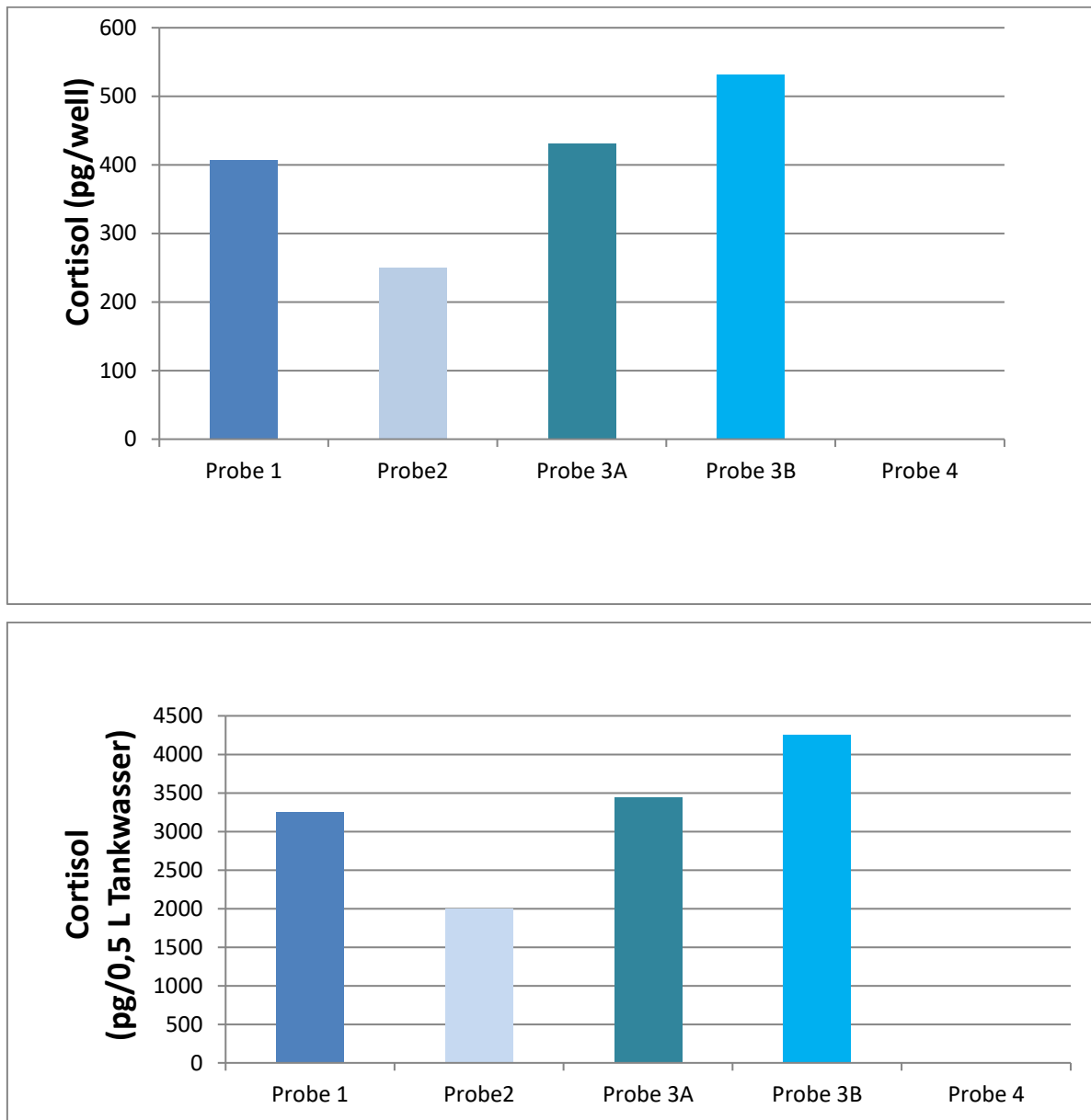


Abbildung 13: Säulendiagramm Probenvergleich

Ergebnisse der Probe 1 stammen aus einem 0,5 L Tank mit Sichtschutz, in dem ein Fisch für fünf Stunden gehalten wurde. Das Männchen zeigte in den fünf Stunden erhöhte Bewegungsaktivität und schwamm vermehrt in eine Ecke. Die Cortisolwerte der zweiten Probe stammen aus dem Tank ohne Sichtschutz, dieses Exemplar zeigte ein ruhiges Verhalten. Probe 3 wurde in 3A und in 3B geteilt, da das gesamte Volumen 1L war. Die Tiere zeigten anfänglich territoriales Verhalten. Für die Probe 4 wurden 0,5 L aus dem frischen Tankwasser entnommen und es war kein Cortisol messbar.

Der UV-VIS Detektor der HPLC konnte die geringen Mengen nicht detektieren, wodurch die gesammelten Fraktionen direkt in den Immunoassay eingesetzt wurden. Nach Eindampfen und Wiederaufnehmen in Puffer gab es genug Material für genau eine Messung mit dem Cortisol EIA. Der Cortisolstandard eluierte in den Fraktionen 34-36. Daher wurden die Fraktionen 30 bis 39 in den EIA eingesetzt. Wie in Tabelle 1 ersichtlich, wurden in den Fraktionen 30-39 wenige pg immunoreaktives Cortisol gemessen werden, wobei mehrere (meistens zwei) Peaks festgestellt werden konnten.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Studie sollte geklärt werden, ob es möglich ist bei *Nothobranchius furzeri*, eine minimal invasive Cortisolmessung aus dem Wasser durchzuführen bzw. ob das Hormon überhaupt nachweisbar ist. Da dieser Fisch bei den Männchen eine Größe von ca. 100 mm erreicht (Jubb, 1981) war die Fragestellung, ob es bei dieser geringen Größe möglich ist, Cortisol aus dem Wasser zu detektieren oder ob die Menge des Hormons zu gering ist.

Nur gesunde Tiere bringen gute vergleichbare Ergebnisse in der Forschung. Ist es möglich Stresshormone im Wasser zu messen, kann man frühzeitig eingreifen, um Krankheiten vorzubeugen oder die Haltung verbessern. Je mehr man über das Stresslevel der Tiere weiß desto besser kann man auf die Bedürfnisse der Fische eingehen.

Die Bedeutung und die Auswirkungen einer Reaktion der Fische auf externe und interne Umweltveränderungen wäre ohne eine Klassifizierung, Quantifizierung, Verfeinerung und Interpretation von Stressindikatoren unklar (Schulte 2014). In dieser Studie waren die Stressoren: Handling, Umsetzen in einen separaten Behälter, die Anwesenheit von Artgenossen mit und ohne Sichtschutz, einzeln und gemeinsam in einem Behälter.

Wenn Fische Stress ausgesetzt sind wird durch das Nervensystem Adrenalin in die Blutbahn abgegeben, darauf folgt das Hormon Cortisol welches den Fisch auf eine Reaktion z.B. Flucht vorbereitet (Mazeaud et al. 1977). In Folge steigt der Blutzuckerspiegel, rote Blutkörperchen, Herzschlag, Ventilationsrate und Magen Darmtrakt hat eine erhöhte Aktivität. Selbst durch eine kurzfristige Belastung wird diese Reaktionskette ausgelöst (Ostrander 2000). Durch Stressoren nehmen Tiere weniger Nahrung auf (Wedemeyer et al. 1976) und auch die Fortpflanzung kann beeinträchtigt werden (Carragher und Sumpter 1990). Die Erhöhung von Cortisol führt zu einer Supprimierung des Immunsystems und ist ein häufiges Anzeichen für schlechte Haltung dadurch kann es bei Fischen zu Infektionen kommen (Ostrander 2000).

Es wurden 4 männliche Tiere mit und ohne Sichtschutz in separate Becken gesetzt, 2 Männchen alleine und 2 Männchen gemeinsam in einem Behälter. Die Hypothese war, dass durch das territoriale Verhalten und der strikten Hierarchie der Männchen dieser Art (Dodzian et al. 2018) eine höhere Konzentration der Glucocorticoide bei den Tieren bestehen wird, die sich sehen können.

Das Männchen aus der Probe 1 hatte einen Sichtschutz zu den anderen Tieren, das Tier zeigte in den fünf Stunden erhöhte Bewegungsaktivität und schwamm vermehrt in eine Ecke und wirkte unruhig. Eine Erklärung könnte sein, dass dies mit dem Wechsel in ein neues Becken

zusammenhing. Der Wert von 6,5 pg/ml ist relativ hoch. Es spricht einerseits gegen die Hypothese, dass ein Tier weniger Hormone ausschüttet, wenn er Konkurrenten nicht sieht. Das gestresste Verhalten des Männchens aus Probe 1 ist möglicherweise eine individuelle Reaktion auf das neue Becken für den Versuch, um das zu überprüfen müssten mehrere Messungen gemacht werden.

Das männliche Tier aus Probe 2 hatte Sichtkontakt zu einem Artgenossen, es verhielt sich ruhig und wirkte nicht gestresst und hatte einen Wert von 4 pg/ml.

Die Probe 3 wurde aufgeteilt in 3A und 3B. Der Grund dafür war, dass immer die gleiche Menge an Wasser pro Fisch durch den Filter (Cartridge Sep-Pak C18) laufen soll, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Vermutlich ist diese territoriale Spezies (Dodzian et al. 2018) vermehrt gestresst, wenn sich ein zweites Tier im Tank befindet. In der ersten Stunde zeigten sie ein territoriales Verhalten; ein Männchen drängte das andere Tier in eine Ecke. Die beiden Ergebnisse unterscheiden sich in der Menge der Steroide, bei 3A waren es 8,5 pg/ml und bei 3B 6,9 pg/ml. Durch eine unterschiedliche Verteilung der Steroide im Wasser könnte es zu diesen Unterschieden in den beiden Ergebnissen gekommen sein. Probe 4 war das frische Tankwasser und diente als Negativprobe. Darin waren wie erwartet keine Steroide messbar.

Steroidhormone werden typischerweise entweder mittels Radioimmunoassay oder Enzymimmunoassay in Plasma oder Gewebehomogenaten gemessen (Pottinger 2008). In dieser Studie wurde HPLC kombiniert mit einem Cortisol EIA verwendet. Das Probenmaterial reichte genau für eine Messung. Es stellte sich die Frage, ob im Wasser reines Cortisol vorhanden ist, oder ob verwandte Metaboliten ausgeschieden und mitgemessen werden. Immunoassays sind zwar sehr empfindlich, aber nicht besonders spezifisch, dh. sie können ähnliche Substanzen (Metaboliten) miterfassen. Deswegen ist nicht jeder Immunoassay gleich gut geeignet für ein Probenmedium (Zeugswetter et al. 2013). Die Ergebnisse zeigten, dass mehrere Peaks vorliegen, was darauf hindeutet, dass nicht nur Cortisol, sondern auch reduzierte Metaboliten im Wasser vorhanden waren.

In einer vergleichbaren Studie wurde eine minimal invasiver Messung von Cortisol aus dem Wasser mittels EIA bei Zebrafischen, *Danio rerio*, durchgeführt (Felix et al. 2013). In einem Projekt mit Wolfsbarschen beschäftigte man sich mit der Cortisolmenge, die auch ohne Stressoren in das umgebende Wasser ausgeschüttet wird. Diese zeigten innerhalb 24h 73,3-471,0 ng/ml Cortisol, es waren 5 Fische in einem Behälter mit 35 kg m³ Salzwasser. Für die Proben

aus dem Wasser wurden 1 L aus dem Becken entnommen und für die spätere Aufbereitung eingefroren (Fanouraki et al. 2009). Diese Proben wurden sofort aufbereitet und mit EIA ausgewertet. Vergleicht man die Werte mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Studie mit *N. furzeri*, ist die höchste Menge in 5 h von 8,5 pg/ml sehr niedrig. Man sollte aber berücksichtigen, dass der männliche *N. furzeri* nur bis zu 100 mm groß (Jubb 1981) wird und die Tatsache, dass die Fische dieser zwei Studien unterschiedlich lange im Wasser waren, was einen gravierenden Unterschied machen kann. Andere Studien beschäftigen sich mit der Messung aus dem Blut. Messungen sind sowohl aus dem Plasma als auch die Ganzkörpercortisol-Konzentration mit EIA-Kit möglich (Henderson und Small 2019). Um diese Ergebnisse aus dem Blut zu erhalten, ist es Teil der Methodik die Tiere nach dem Experiment zu euthanasieren um die Messungen auch vergleichen zu können (Henderson und Small 2019). Bedingt durch die Größe bei *N. furzeri* ist die Probensammlung des Blutes schwierig, vor allem bei weiblichen Tieren (Henderson und Small 2019). Daher wäre eine Cortisolmessung aus dem Wasser mit einer minimal invasiven Methode nicht nur aus ethischer Sicht besser, denn die Tiere müssten dann nicht mehr euthanasiert werden, sondern auch für die Forscher, da die Gewinnung von Blut viel Geschick und Zeit fordert.

Der Studienaufbau könnte mit einer höher gewählten Stichprobenanzahl verbessert werden, um eine statistische Auswertung zu ermöglichen. Bei der Methodik wäre eine automatisierte Probenentnahme des Wassers sinnvoll, da die Entnahme und Vorbereitung der Proben für die Aufbewahrung sehr viel Zeit in Anspruch nehmen. In einer Folgestudie könnten auch weitere Faktoren berücksichtigt werden um ein besseres Bild über das Stresslevel der Tiere zu erhalten.

Vorliegendes Pilotprojekt zeigte, dass nach einer HPLC Trennung mit einem Cortisol EIA immunreaktive Substanzen im aufbereiteten Wasser gemessen werden konnten. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob man auch auf die HPLC verzichten kann. Anhand einer größeren Probenanzahl müssen auch die physiologisch vorkommenden Werte bzw. der Einfluss von Stressoren erhoben werden.

5. Zusammenfassung

In dieser Studie ging es um einen Pilotversuch mit dem Fisch *Nothobranchius furzeri*, der sich darauf konzentrierte festzustellen, ob eine minimal invasive Messung von Cortisol aus dem Wasser möglich ist. Es wurden vier männliche Tiere gewählt, zwei Tiere in einem eigenen Becken und zwei in einem gemeinsam mit und ohne Sichtschutz. Die Hypothese war, dass Tiere dieser territorialen Spezies mehr Stresshormone ausschütten, wenn sie ihren Konkurrenten sehen oder physischen Kontakt haben. Die Fische haben sich teilweise territorial verhalten aber eine genauere Aussage kann nur mit einer höheren Tieranzahl bei Folgestudien erreicht werden. Die Messung wurde mittels HPLC (High Performance Liquid Chromotography) und Cortisol EIA (Enzymimmunoassay) durchgeführt. Es konnte dabei immunoreaktive Substanzen gemessen werden, wobei neben Cortisol auch verwandte Metaboliten im Wasser ausgeschieden und miterfasst wurden. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass es möglich sein sollte nach einem Aufarbeitungsschritt Cortisol aus dem Wasser direkt mittels EIA zu messen. Die Etablierung minimal invasiver Cortisolmessungen und das daraus gewonnene Wissen kann zu einer Reduzierung der Tierzahl in Versuchen, sowie eine Verbesserung bei der Haltung und somit auch zu besser reproduzierbaren Forschungsergebnissen führen.

6. Summary

This was a pilot study with *Notobranchius furzeri* to evaluate whether cortisol can be measured in water samples. For this study four male animals were used. Two of them were kept separate, while two fish were put together in one tank. A screen was installed into one of the tanks holding only one fish. The hypothesis was that due to their territorial behaviour, the fish, which can see their rivals or share a tank with their rival would have higher cortisol levels. Some fish showed territorial behaviour, but for significant conclusions more samples are necessary. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) and a cortisol EIA (enzyme immunoassay) were used to measure immunoreactive substances in the water. Besides cortisol, also related metabolites were found. The result indicate that it should be possible to measure cortisol with an EIA in the water after a cleanup step, maybe even without involving HPLC. The use of minimal invasive method for cortisol measurement and the acquired knowledge can help to decrease the sample size in future studies and to further improve the husbandry conditions for this fish species in laboratory conditions.

7. Ethikbescheid



ZENTRUM FÜR
BIOMEDIZINISCHE FORSCHUNG
MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN
Abteilung für Biomedizinische Forschung

Zur Vorlage an der
Veterinärmedizinischen Universität Wien

Medizinische Universität Wien
Zentrum für Biomedizinische
Forschung

**Abteilung für Biomedizinische
Forschung**

Währinger Gürtel 18-20, 1090 Wien
T: +43 (0)1 40400-52220
bruno.podesser@meduniwien.ac.at
www.meduniwien.ac.at/dbf

Ethik-Kommission zur Beratung und
Begutachtung von Forschungs-
projekten am Tier

Univ.-Prof. Dr. Bruno K. Podesser
Koordinator

Wien, 25.06.2020

Feststellung über das nicht Vorliegen eines Tierversuches im Sinne des TVG 2012

Sehr geehrte Damen und Herren,

Im Zuge des Genehmigungsverfahrens (Geschäftszahl 2020-0.133.147) der
Notobranchius furzeri Haltung am Zentrum für Anatomie und Zellbiologie, an
der Abteilung für Entwicklungsbiologie der Medizinischen Universität Wien,
wurde unter anderem die Haltung der männlichen Tiere im Sinne der 3R
optimiert. Um den Stress der Tiere im jeweiligen Becken zu reduzieren,
wurde ein Sichtschutz zwischen den jeweiligen Haltungseinheiten
eingezogen.

Eine begleitende Maßnahme war die Messung der Cortisolwerte im
Aquarienwasser, aus der die vorliegende Diplomarbeit „**Minimal invasive
Cortisolmessung aus dem Wasser – Ein Pilotversuch bei Nothobranchius
furzeri**“ hervorging.

Diese Messung stellt daher keinen Tierversuch im Sinne des §2 TVG idGF.
dar, sondern ist im Sinne des § 1, Abs. 3, Z. 2, eine Verbesserung der
Bedingungen für die Zucht, Unterbringung, Pflege und Verwendung von
Tieren in Tierversuchen.

Mit besten Grüßen,

Univ.-Prof. Dr. Bruno K. Podesser
Leiter des Zentrums für Biomedizinische Forschung

Dr. Roberto Plasenzotti
Abteilung für Labortierkunde und -genetik

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	
adrenocorticotrope Hormon	8
EIA	
Enzymimmunoassay	12
GRZ	
Gona Re Zhou Reservat	4
MZM	
Mozambique	4
HPLC	
High performance liquid chromatography	7
RIA	
Radioimmunoassay	7

7 Tabellen und Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: adulte N. furzeri Männchen.	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung: Stressantwort Cortisol (aus Schreck, 2016).....	7
Abbildung 3: Stressantwort nach Ostrander (2000).....	8
Abbildung 4: von links nach rechts: 1 Fisch mit Sichtschutz, 2 Fische einzeln im Tank ohne Sichtschutz, 2 Fische mit Sichtschutz gemeinsam im Tank.....	11
Abbildung 5: 1 Männlicher Fisch mit Sichtschutz (0,5 LI)	12
Abbildung 6: 2 männliche Fische gemeinsam in einem Tank mit 1L mit Sichtschutz.....	12
Abbildung 7: 2 männliche Fische im separaten Tank ohne Sichtschutz 0,5L jeweils.....	12
Abbildung 8: Wasserentnahme um 16.30 von 5 Proben.	13
Abbildung 9: Stationen für Probenaufarbeitung, 1: Methanol, 2: Destilliertes Wasser, 3: Wasser entfernen (trocknen), 4: Probenapplikation, 5: Wasser entfernen.....	13
Abbildung 10: Spritze mit Cartridge Sep-Pak C18.....	14
Abbildung 11: Rollerquetschpumpe von Stöckert Instrumente München, Typ: 10-10-00; Fabriknummer: 10H 1496; 220 V ;50 Hz; 1,5 A.....	14
Abbildung 12: Probenapplikation mit Rollerpumpe.....	14
Abbildung 13: Säulendiagramm Probenvergleich.....	17
Abbildung 13: Säulendiagramm Probenvergleich.....	17

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ergebnisse Cortisol	16
--------------------------------------	----

Literaturverzeichnis

- Avella M, Masoni A, Bornancin M, Mayer-Gostan N. 1987. Gill morphology and sodium influx in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) acclimated to artificial freshwater environments. *Journal of Experimental Zoology*, 241(2):159–169.
- Bern HA. 1990. The caudal neurosecretory system: quest and bequest. *Prog Clin Biol Res*, 342:242–249.
- Bern HA. 2015. The “New Endocrinology”: Its Scope and Its Impact. *American Zoologist*, 30(4):877–885.
- Blazek R, Polacik M, Reichard M. 2013. Rapid growth, early maturation and short generation time in African annual fishes. *EvoDevo*, 4 (1):24.
- Carragher JF, Sumpter JP. 1990. The effect of cortisol on the secretion of sex steroids from cultured ovarian follicles of rainbow trout. *General Comparative Endocrinology*, 77 (3):403–407.
- Dodzian J, Kean S, Seidel J, Valenzano DR. 2018. A protocol for laboratory housing of turquoise killifish (*Nothobranchius furzeri*). *Journal Visualized Experiments* 134: e57073.
- Eales JG, Maclatchy DL. 1989. The relationship between T3 production and energy balance in salmonids and other teleosts. *Fish Physiology Biochemistry*, 7(1-6):289–293.
- Ellis T, Sanders MB, Scott AP. 2013. Non-invasive monitoring of steroids in fishes. *Wiener tierärztliche Monatsschrift*, 100(9/10):255–270.
- Fanouraki E, Papandroulakis N, Pavlidis M. 2009. Non-invasive stress indicators in Mediterranean mariculture: effect of fish size on water cortisol release rate. *Proceedings 9th Symposium on Oceanography & Fisheries*, 2009, Vol II, 711–715
- Felix AS, Faustino AI, Cabral EM, Oliveira RF. 2013. Noninvasive measurement of steroid hormones in zebrafish holding-water. *Zebrafish*, 10(1):110–115.
- Furness AI. 2016. The evolution of an annual life cycle in killifish: adaptation to ephemeral aquatic environments through embryonic diapause. *Biological Reviews*, 91(3):796–812.
- Furness AI, Lee K, Reznick DN. 2015. Adaptation in a variable environment: Phenotypic plasticity and bet-hedging during egg diapause and hatching in an annual killifish. *Evolution*, 69(6):1461–1475.
- Genade T, Benedetti M, Terzibasi E, Roncaglia P, Valenzano DR, Cattaneo A, Cellerino A. 2005. Annual fishes of the genus *Nothobranchius* as a model system for aging research. *Aging Cell*, 4(5):223–233.
- Haas R. 1976. Sexual selection in *Nothobranchius guentheri* (Pisces: Cyprinodontidae). *Evolution*, 30(3):614–622.
- Hartmann N, Reichwald K, Platzer M, Englert C. 2013. Ein kurzlebiger Fisch als Modell für die Altersforschung. *Biologie in unserer Zeit*, 43(2):87–95.
- Henderson DW, Small BC. 2019. Rapid acclimation of the cortisol stress response in adult turquoise killifish *Nothobranchius furzeri*. *Laboratory Animals*, 53(4):383–393.
- Jubb DRA. 1981. *Nothobranchius*. Tfh Publications.
- Kenyon CJ, Jones IC, Dixon RN. 1980. Acute responses of the freshwater eel (*Anguilla anguilla*) to extracts of the corpuscles of Stannius opposing the effects of stanniosomatiectomy. *General Comparative Endocrinology* 41(4):531–538.
- Laurent P, Perry SF. 1990. Effects of cortisol on gill chloride cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. *Cell and Tissue Research*, 259(3):429–442.

- Lindsay S. 1992. High performance liquid chromatography. 2nd edition, Barnes, J. (Ed), John Wiley & Sons Inc., Hoboken, USA. .
- Litjens RAJ, Quickenden TI, Freeman CG. 1999. Visible and near-ultraviolet absorption spectrum of liquid water. *Applied Optics*, 38(7):1216–1223.
- Mazeaud MM, Mazeaud F, Donaldson EM. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: Some new data with a general review. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106(3):201–212.
- McCormick SD. 1995. 11 Hormonal control of gill Na⁺,K⁺-ATPase and chloride cell function. *Fish Physiology*, 14:285–315.
- Ostrander GK. 2000. The laboratory fish. Academic Press, San Diego.
- Palme R, Möstl E, Brem G, Schellander K, Bamberg E. 1997. Faecal metabolites of infused 14C-progesterone in domestic livestock. *Reproduction in Domestic Animals*, 32(4):199–206.
- Passos C, Reyes F, Tassino B, Rosenthal GG, González A, Foster S. 2013. Female annual killifish *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) attend to male chemical cues. *Ethology*, 119(10):891–897.
- Polacik M, Reichard M. 2010. Diet overlap among three sympatric African annual killifish species *Nothobranchius spp.* from Mozambique. *Journal of Fish Biology*, 77(3):754–768.
- Polacik M, Donner M, Reichard M. 2011. Age structure of annual *Nothobranchius* fishes in Mozambique: is there a hatching synchrony? *Fish Biology* 78(3):796–809.
- Pottinger TG. 2008. The stress response in fish - mechanisms, effects and measurement. In: Branson EJ. (ed.) *Fish Welfare*. Oxford, UK, Wiley-Blackwell, 32–48.
- Reichard M, Polacik M, Sedláček O. 2009. Distribution, colour polymorphism and habitat use of the African killifish *Nothobranchius furzeri*, the vertebrate with the shortest life span. *Journal Fish Biology*, 74(1):198–212.
- Schulte PM. 2014. What is environmental stress? Insights from fish living in a variable environment. *Journal Experimental Biology*, 217(Pt 1):23–34.
- Sumpter JP, Dye HM, Benfey TJ. 1986. The effects of stress on plasma ACTH, alpha-MSH, and cortisol levels in salmonid fishes. *General Comparative Endocrinology*, 62(3):377–385.
- Vijayan MM, Ballantyne JS, Leatherland JF. 1991. Cortisol-induced changes in some aspects of the intermediary metabolism of *Salvelinus fontinalis*. *General Comparative Endocrinology*, 82(3):476–486.
- Vrtilík M, Zak J, Blazek R, Polacik M, Cellerino A, Reichard M. 2018. Limited scope for reproductive senescence in wild populations of a short-lived fish. *Naturwissenschaften*, 105(11-12):68.
- Wedemeyer GA, Meyer FP, Smith LS. 1976. Environmental stress and fish diseases. TFH Publications, Inc., Neptune City, N.J.
- Wendelaar Bonga SE. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77(3):591–625.
- Wourms JP. 1972. The developmental biology of annual fishes. 3. Pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. *Journal Experimental Zoology*, 182(3):389–414.

- Zeugswetter F, Neffe F, Schwendenwein I, Tichy A, Möstl E. 2013. Configuration of antibodies for assay of urinary cortisol in dogs influences analytic specificity. *Domestic Animal Endocrinology*, 45(2):98–104.
- Zupkovitz G, Lagger S, Martin D, Steiner M, Hagelkruys A, Seiser C, Schofer C, Pusch O. 2018. Histone deacetylase 1 expression is inversely correlated with age in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Histochemistry Cell Biology*, 150(3):255–269.