



**Aktuelle
Arbeiten zur
artgemäßen
Tierhaltung
2000**



Bestimmung von Kortisolmetaboliten im Kot von Nutztieren zur nicht-invasiven Erfassung von Belastungen

Determination of Faecal Cortisol Metabolites in Domestic Livestock for Non-invasive Monitoring of Disturbances

RUPERT PALME, ERICH MÖSTL

Zusammenfassung

Unter Stress bildet die Nebennierenrinde vermehrt Kortisol, dessen Konzentration im Blut als ein Parameter zur Beurteilung von Belastungen herangezogen wird. Da die Blutentnahme in den meisten Versuchsanordnungen selbst ein Stressor ist und somit die Messung stört, sind nicht invasive Methoden zur Quantifizierung wichtig. Eine Bestimmung in Milch, Speichel oder Harn ist schon seit längerer Zeit bekannt, wobei aber die Probennahme nur beschränkt möglich oder technisch aufwendig ist. Untersuchungen mit radioaktivem Kortisol bei Haustieren zeigten, dass Kortisolmetaboliten auch mit dem Kot ausgeschieden werden, der einfach und ohne Beunruhigung des Tieres gesammelt werden kann. Eine Messung dieser Ausscheidungsprodukte (unverändertes Kortisol ist nicht nachweisbar) im Kot wurde erstmals von PALME und MÖSTL (1997) für das Schaf beschrieben. Dieser Enzymimmunoassay misst 11,17-Dioxoandrosterone, eine Gruppe von Metaboliten, die nach Abspaltung der Seitenkette aus Kortisol entsteht.

Zwischen der Sekretion von Kortisolmetaboliten über die Galle in den Darm bis zum entsprechenden Kotabsatz vergehen ungefähr 0,5 (Wiederkäuer) bzw. 1 Tag (Pferd). Die Konzentration im Kot ist daher ein Parameter für die Kortisolproduktion vor dieser Zeit. Die biologische Relevanz einer Bestimmung der Kotmetaboliten konnte bei Nutztieren (Schaf, Rind und Pferd) durch mehrere Untersuchungen, wie etwa nach pharmakologischer Stimulation bzw. Suppression der Nebennierentätigkeit, sowie bei Transport, Umstellungen aber auch schmerzhaften Erkrankungen, wie einer Kolik beim Pferd, bestätigt werden.

Die Messung von Kortisolmetaboliten im Kot eignet sich also, ähnlich wie die Messung von Kortisol im Blut, zur Beurteilung von Belastungen. Dabei ist eine Überlagerung der Ergebnisse durch einen Stress der Probennahme nicht gegeben. Damit steht für die Abklärung vieler wichtiger Fragen im Bereich von Tierhaltung und Tierschutz ein zusätzliches Hilfsmittel zur Verfügung. Dies stellt eine wichtige Ergänzung zur Beobachtung des Verhaltens der Tiere dar, da es auf nicht invasive Weise eine Erhebung endokriner Parameter zur Belastung der Tiere ermöglicht.

Summary

In mammals under stress glucocorticoids are secreted by the adrenal cortex. Such hormone concentrations in blood have been widely used to reflect the effects of various stressors. However, as blood sample collection itself causes stress, non-invasive methods for the determination of glucocorticoids (or their metabolites) are a prerequisite for assessing stress in these animals. Above all, faecal samples offer the advantage that they can be collected easily without any need to handle the animal. On the basis of characterized faecal metabolites of infused ¹⁴C-cortisol in sheep an enzyme immunoassay (EIA) for 11,17-dioxoandrosterones, a

group of metabolites derived from cortisol by side chain cleavage, was established (PALME and MÖSTL 1997).

It has to be taken into account that there is a species specific lag time (e.g.: 0.5 days for ruminants or 1 day in horses) between the secretion of cortisol metabolites via the bile in the intestine and the appearance of this signal in the faeces. Therefore concentrations of faecal metabolites are a reflection of adrenocortical activity before that specific time period. The biological relevance of this method has been confirmed in ruminants (sheep, cattle) and horses after pharmacological stimulation or suppression of the cortisol production. In addition, transportation, regrouping and painful situations such as colics in horses were well reflected in faecal 11,17-dioxoandrosterone concentrations.

Therefore measurement of faecal cortisol metabolites is suited for monitoring adrenocortical activity and thus disturbances in animals. Unlike blood, faecal samples offer the advantage that they can be collected easily without stressing the animals. Thus, the established method should be a valuable non-invasive tool in a variety of research fields such as animal welfare (handling, housing and transportation) but also in ethological studies.

1 Einleitung

Die im Organismus unter Belastungssituationen ablaufenden Reaktionen stellen ein komplexes Geschehen dar. Physische und emotionale Stressoren rufen eine Vielzahl von Reaktionen im Organismus hervor (AXELROD and REISINE 1984, LADEWIG 1994, TERLOUW et al. 1997). Unterschiede in den Stresseinflüssen und im individuellen Charakter von Tieren führen dabei zu einer großen Variabilität der Stressantworten. Daraus folgt, dass die Beurteilung einer möglichen Stresssituation (z. B. in Verbindung mit einem Haltungs- oder Managementsystem) nur unter Anwendung verschiedener (z. B. ethologischer, endokrinologischer bzw. biochemischer) Kriterien sinnvoll ist (LADEWIG 1994).

Im Stress werden bei Säugetieren das hypothalamo-hypophysär-adrenokortikale sowie das sympatho-adrenomedulläre System aktiviert. Dies führt zu einem Anstieg von Glukokortikoiden bzw. Katecholaminen im Blut. Daher wird die Konzentration von Glukokortikoiden (Kortisol) im Blut als ein endokriner Parameter zur Beurteilung von Belastungen bestimmt (LADEWIG 1994).

2 Probenmaterial

Die Bestimmung der Kortisolkonzentration im Probenmedium Blut stellt(e) die am häufigsten verwendete Methode dar, um Aussagen über die Aktivität der Nebennierenrinde machen zu können (LADEWIG 1994). Dabei ist die Blutentnahme selbst aber ein kritischer Schritt, der in den meisten Versuchsanordnungen einen Stress darstellt und somit das Ergebnis beeinflusst, bzw. besonders bei Zoo- und Wildtieren nur schwer oder gar nicht durchführbar ist. Im Laufe der Zeit sind daher vor allem für wiederholte Blutentnahmen zahlreiche „stressfreie“ Methoden entwickelt worden, wie etwa die Implantation von Dauerkathetern oder der Einsatz von mobilen Blutentnahmesystemen (LADEWIG and STRIBRNY 1988, THIELSCHER et al. 1999). Da solche Methoden aber anspruchsvoll und arbeitsintensiv sind und nur in einem begrenzten Umfang eingesetzt werden können, kommt einer nicht-invasiven Gewinnung des Probenmaterials zunehmend mehr Bedeutung zu.

Eine Bestimmung in Speichel, Milch oder Harn wird schon seit einiger Zeit erfolgreich durchgeführt (z. B. FELL et al. 1985, HAY and MORMÈDE 1998, SCHÖNREITER et al. 1999, VERKERK et al. 1999). Nachteilig ist dabei, dass die Probenahme nur beschränkt möglich (bei Milch etwa nur bei laktierenden Tieren), oder technisch aufwändig (z.B. Harnsammlung) bzw. nur schwer ohne Beunruhigung der Tiere durchzuführen ist. So ist die Speichelgewinnung etwa mit Manipulationen im Kopfbereich verbunden, die ein „Training“ der Tiere erfordern.

Die Quantifizierung von Kortisolmetaboliten im Kot als Parameter für das Stressgeschehen bietet den Vorteil, dass die Proben sehr einfach und ohne Beunruhigung des Tieres gesammelt werden können. Dadurch ist auch ein Einsatz bei groß angelegten Longitudinalstudien möglich. Die durch die Darmpassage auftretende Verzögerung in der Ausscheidung erlaubt außerdem eine rückwirkende Feststellung von belastenden Situationen.

Episodisch auftretende Schwankungen der Blut- bzw. Speichelkortisolkonzentrationen, die ein Problem darstellen bzw. häufige Abnahmen erforderlich machen, werden im Probenmedium Kot (aber auch Milch und Harn) geglättet.

3 Ausscheidung und Metabolisierung

Steroide haben im Blut eine Halbwertszeit von wenigen Minuten (BAMBERG 1994). Sie werden hauptsächlich in der Leber metabolisiert (BROWNE 1992) und als Konjugate über die Niere in den Harn, aber auch über die Galle in den Kot ausgeschieden (Abb. 1). Im Darmtrakt werden diese Verbindungen durch bakterielle Enzyme größtenteils dekonjugiert bzw. vor allem Glukokortikoide noch zusätzlich metabolisiert (MACDONALD et al. 1983). Ein Teil der Steroide wird aus dem Darm rückresorbiert (enterohepatischer Kreislauf), der verbleibende Anteil über den Kot ausgeschieden (LINDNER 1971, TAYLOR 1972, PALME et al. 1996).

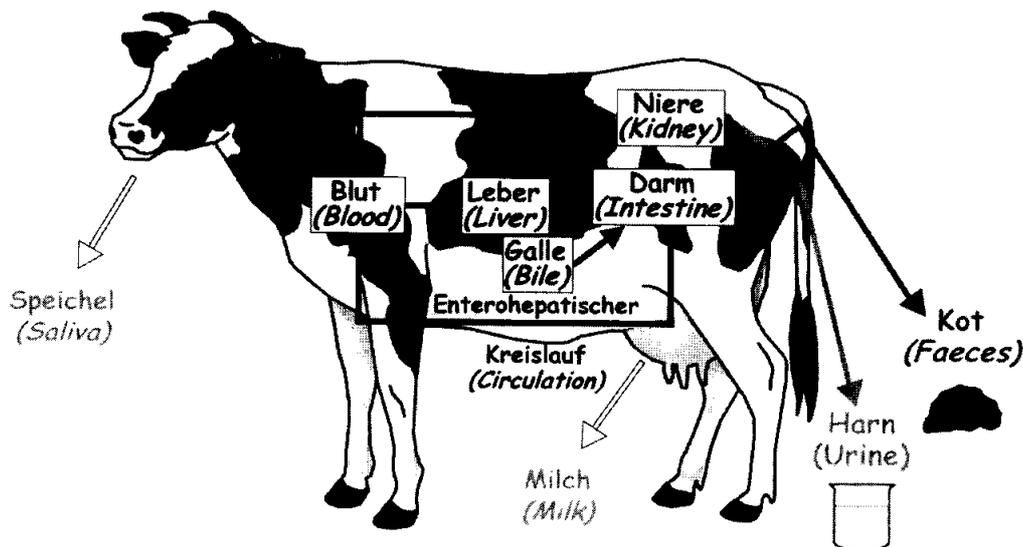


Abb. 1: Schema zur Metabolisierung und Ausscheidung von Steroiden
Scheme of the metabolism and excretion of steroids

Mit Hilfe von radioaktiv markiertem Kortisol konnten der Weg (Abb. 2) und die zeitliche Verzögerung der Ausscheidung, sowie die gebildeten Metaboliten bei verschiedenen Tierarten bestimmt werden. Dabei wurden in jeder Hinsicht ausgeprägte tierartliche Unterschiede festgestellt. So schieden etwa Schweine und Hasen injiziertes ^{14}C -Kortisol zum Großteil über den Harn aus. Bei Hunden, Schafen und Ponys war dieser Anteil geringer aber noch immer größer als 50%. Im Gegensatz dazu dominierte bei Katzen die Ausscheidung über den Kot (PALME et al. 1996, SCHATZ and PALME, 2001, TESKEY-GERSTL et al. 2000).

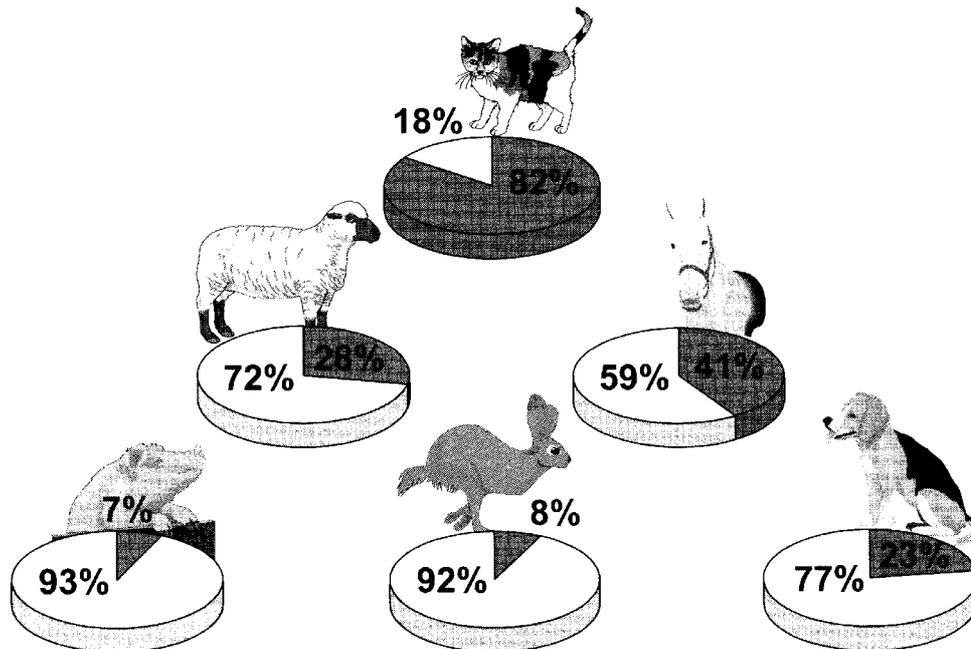


Abb. 2: Prozentsatz der Ausscheidung von injiziertem ^{14}C -Kortisol über Harn (helle Segmente) und Kot (dunkle Segmente) bei verschiedenen Tierarten (PALME et al. 1996, TESKEY-GERSTL et al. 2000, SCHATZ und PALME 2001)

Percentage of injected ^{14}C -cortisol excreted via the urine (light) and faeces (dark) in various mammals

Die Ausscheidung der Kortisolmetaboliten mit dem Harn erfolgt rasch. Maximalkonzentrationen wurden meistens in der ersten Probe nach der Injektion von ^{14}C -Kortisol beobachtet. Hingegen treten sie im Kot mit einer – tierartlich verschieden langen – Verzögerung auf. Diese Zeit entspricht der Darmpassagezeit vom Dünndarm (Einmündungsort der Galle) bis zum Rektum. Sie beträgt beim Wiederkäuer ungefähr einen halben Tag, beim Pferd, Fleischfresser und Hasen einen Tag und beim Schwein rund zwei Tage (PALME et al. 1996, SCHATZ and PALME 2001, TESKEY-GERSTL et al. 2000). Daher spiegelt die Konzentration der Kortisolmetaboliten im Kot die Kortisolproduktion vor dieser Zeit wider.

Besonders im Hinblick auf das im Kot auftretende Metabolitenmuster gibt es starke tierartliche Unterschiede (Abb. 3). Bei den untersuchten Nutztierarten (Wiederkäuer, Pferd und Schwein) sind die Steroide fast ausschließlich unkonjugiert (PALME et al. 1996).

Mittels chromatographischer Methoden wurden beim Schaf eine große Anzahl verschiedener ^{14}C -Metaboliten (> 20) festgestellt werden. Beim Schwein und beim Pferd konnte ein mengenmäßig dominierender Metabolit beobachtet werden. Bei einer näheren Charakterisierung der Metaboliten beim Schaf mittels Massenspektrometrie wurden C_{19} - (durch Verlust der Seitenkette aus Kortisol entstanden) bzw. C_{21} -Metaboliten mit einem Molekulargewicht

von 350 festgestellt. Unverändertes Kortisol bzw. Tetrahydrokortisol war dabei (selbst nach Infusion von 1 g Kortisol) nicht nachweisbar (MÖSTL et al. 2001).

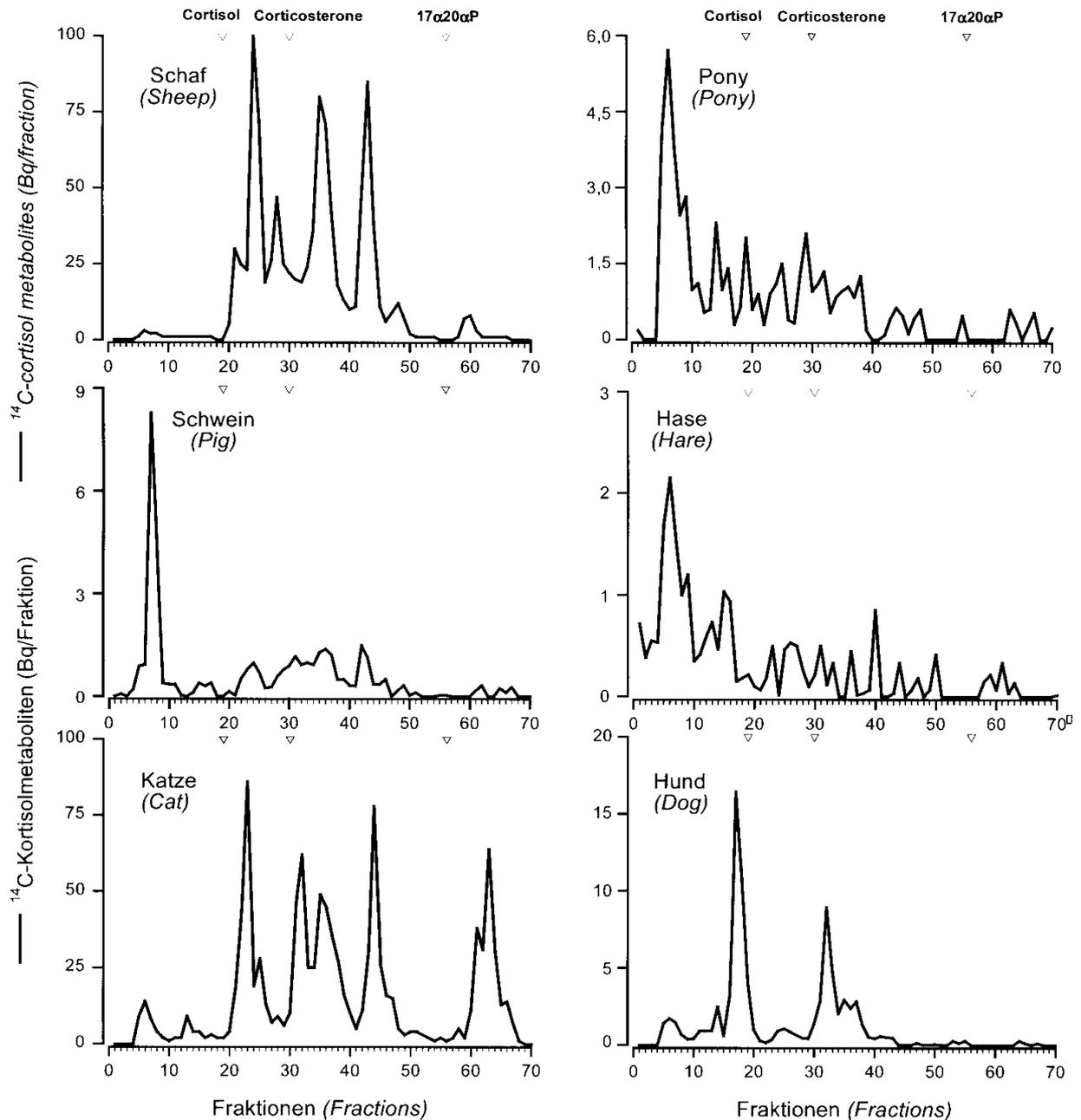


Abb. 3: Chromatographische Auftrennung der im Kot nach Verabreichung von ^{14}C -Kortisol bei verschiedenen Tierarten vorkommenden Metaboliten. Die mit ∇ markierten Fraktionen zeigen die ungefähre Position der entsprechenden Standards an ($17\alpha20\alpha\text{P} = 17\alpha20\alpha$ -dihydroxyprogesterone)

Chromatographic separation of the faecal metabolites present after ^{14}C -cortisol administration in different species. Fractions marked with ∇ represent the approximate elution time of respective standards ($17\alpha20\alpha\text{P} = 17\alpha20\alpha$ -dihydroxyprogesterone, for details of the separation see TESKEY-GERSTL et al. 2000, SCHATZ and PALME, 2001)

4 Etablierung von Enzymimmunoassays (EIAs) zur Bestimmung von Metaboliten in Kotproben

Immunoassays, die für eine Bestimmung von Glukokortikoiden im Blut entwickelt wurden, sind meist aufgrund ihrer hohen Spezifität (unverändertes Kortisol ist im Kot bei den meisten Nutztieren nicht nachweisbar) für eine Bestimmung der Kotmetaboliten nicht geeignet. Auf Basis der charakterisierten Metaboliten von Kortisol gelang die Etablierung von Enzymimmunoassays (EIAs) für ihre Bestimmung. Eine Messung dieser Ausscheidungsprodukte im Kot wurde erstmals von PALME und MÖSTL (1997) für das Schaf beschrieben. Der entwickelte Enzymimmunoassay (11-Oxoätiocholanolon EIA) misst 11,17-Dioxoandrostane (11,17-DOA), eine Gruppe von Verbindungen, die nach Abspaltung der Seitenkette aus Kortisol entsteht. Eine chromatographische Trennung der ¹⁴C-Kortisolmetaboliten in Kotproben und eine anschließende Bestimmung der immunreaktiven Substanzen in den gesammelten Fraktionen konnte für eine Reihe von Tierarten beweisen, dass 11,17-DOA ausgeschieden werden (PALME und MÖSTL 1997, MÖSTL et al. 1999, SCHATZ and PALME 2001, TESKEY-GERSTL et al. 2000).

5 Ergebnisse zur biologischen Relevanz der Methodik

Um die biologische Aussagekraft der entwickelten Assays für Kortikoidmetaboliten zu testen, wurde bei verschiedenen Tierarten (Schaf, Rind, Pferd, Fleischfresser) die Kortisolausschüttung der Nebenniere durch ACTH-Applikation für einen bestimmten Zeitraum erhöht bzw. durch Injektion von synthetischen Glukokortikoiden unterdrückt (PALME et al. 1999, SCHATZ and PALME 2001). Dazu wurden vor bzw. nach Applikation Kot-, und bei den Nutztieren auch Blutproben (mittels Katheter), gesammelt. Die Konzentration von Kortisol im Blut bzw. der 11,17-Dioxoandrostane im Kot wurde mittels EIA bestimmt. Die Konzentration der über den Kot ausgeschiedenen Kortisolmetaboliten spiegelte (mit der tierartlich spezifischen Verzögerung) die Verlaufskurve der Kortisolkonzentration im Blut und damit die Nebennierenrindenaktivität wider (Abb. 4a und b). Bei Kühen wurden zusätzlich unterschiedliche Mengen von ACTH verabreicht. Der beobachtete Anstieg war im Blut nicht, im Kot hingegen gut ($r = 0,77$; $P = 0,006$) mit der verabreichten Dosis korreliert (PALME et al. 1999). Dies deutet darauf hin, dass eine Messung der Kotmetaboliten die gebildete Menge an Kortisol (und damit auch das Ausmaß der Belastung) gut widerspiegelt. Außerdem konnte auch gezeigt werden, dass die im Blut ausgeprägten episodischen Schwankungen der Kortisolkonzentrationen bei den Ausscheidungsmetaboliten im Kot geglättet (Faktor 5-10) werden. Dies unterstreicht die Vorteile der nicht invasiven Kotanalytik zur Erhebung von Belastungen beim Rind.

Um die Anwendbarkeit dieser Methode unter Praxisbedingungen zu demonstrieren, wurden Kühe im LKW transportiert (2 h) bzw. nur in einen stationär bleibenden Wagen verladen (~3 h). Nach ca. 12 h konnte in beiden Fällen ein Anstieg der Kortisolmetabolitenkonzentration im Kot (Transportgruppe: 550–3910 % Verladegruppe: 210–680 %) festgestellt werden (Abb. 4c und d). Wurden die Tiere wieder in den gewohnten Stall zurückgebracht, so sanken die Werte rasch ab (PALME et al. 2000). In einer neuen Umgebung wurden hingegen über einen längeren Zeitraum hindurch erhöhte Mengen an Glukokortikoiden gebildet (MÖSTL et al. 2001). Der Verlauf der Ausscheidung der Kortisolmetaboliten deutete darauf hin, dass der Transport, das Verladen bzw. die Aufstallung in dem für die Kuh ungewohnten

Stall (PALME et al. 2000, MÖSTL et al. 2001) aber auch schmerzhafte Erkrankungen, wie etwa eine Kolik beim Pferd (MERL et al. 2000), zu einer deutlich erhöhten Kortisolproduktion führen.

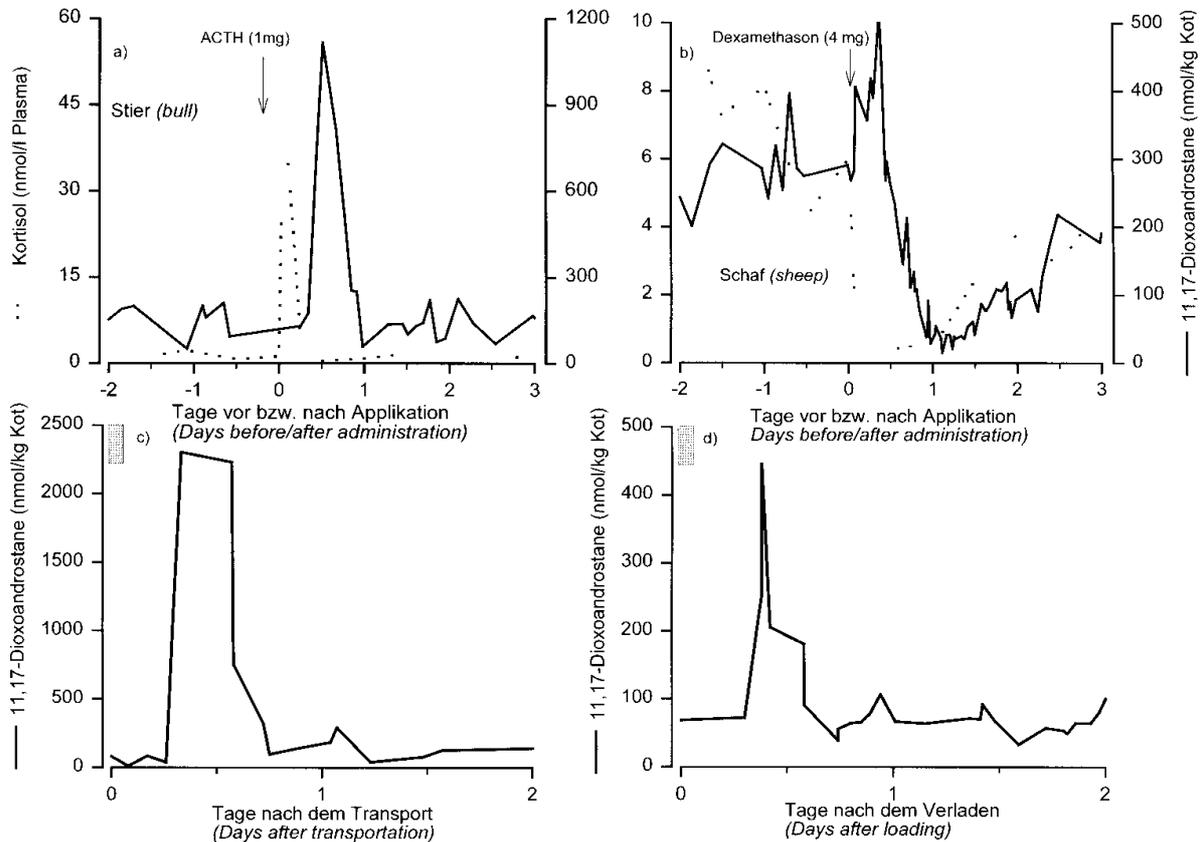


Abb. 4: Verlauf der Kortisolkonzentration im Blut bzw. der Kortisolmetaboliten im Kot nach (a) ACTH und (b) Dexamethasonverabreichung, sowie der Konzentration der 11,17-DOA in den Kotproben einer Kuh nach (c) Transport oder (d) Verladen
Concentrations of plasma cortisol (nmol/l plasma) and its faecal metabolites (11,17-DOA, nmol/kg faeces) after (a) ACTH and (b) dexamethasone administration, and concentrations of 11,17-DOA in faecal samples of a cow after (c) transportation or (d) loading

Da bei allen Experimenten in denen Kortisol oder seine Metaboliten in verschiedenen Medien gemessen wurden (LADEWIG 1994, PALME et al. 1999, SCHATZ and PALME 2001), große individuelle Unterschiede im Bezug auf Basal- bzw. Maximalwerte auftraten, ist es erforderlich Longitudinalstudien (PALME et al. 1999), in denen jedes Tier als seine eigene Kontrolle fungiert, durchzuführen. Gerade hierbei kommen die Vorteile der nicht invasiven Kotanalytik zum Tragen.

Obwohl die gebildeten Kortisolmetaboliten (11,17-DOA) in Gegenwart von Säuren und Hitze stabil sind, können durch bakterielle Enzyme bei einer Lagerung bei Raumtemperatur weitere Veränderungen auftreten. Es kann dabei, individuell verschieden stark, zu einem Ansteigen der gemessenen 11,17-DOA Werte kommen. Ein schnelles Einfrieren der Proben und ein Auftauen bei 95°C unterbindet diese Reaktionen (MÖSTL et al. 1999).

6 Schlussfolgerung

Die Messung von Kortisolmetaboliten im Kot eignet sich, ähnlich wie die Messung von Kortisol im Blut, zur Beurteilung von Belastungen. Dabei ist aber keine Überlagerung der Ergebnisse durch den Stress der Probennahme gegeben. Damit steht für die Abklärung vieler wichtiger Fragen im Zusammenhang mit Haltung und Schutz von Tieren ein zusätzliches Hilfsmittel zur Verfügung. Dies stellt eine wichtige Ergänzung zur Beobachtung des Verhaltens der Tiere dar, da es auf nicht invasive Weise eine Erhebung endokrinologischer Daten zur Belastung der Tiere ermöglicht.

7 Literatur

- AXELROD, J.; REISINE, T.D. (1984): Stress hormones: Their interaction and regulation. *Sci.* 224: 452–459
- BAMBERG, E. (1994): Chemie, Biochemie und Nachweis von Steroidhormonen. In: DÖCKE, F. (Hrsg.) *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena – Stuttgart: 31–40
- BROWNIE, A.C. (1992): The metabolism of adrenal cortical steroids. In: *The adrenal gland*, James, V.H.T. (ed). Raven Press, New York: 209–224
- FELL, L.R.; SHUTT, D.A.; BENTLEY, C.J. (1985): Development of a salivary cortisol method for detecting changes in plasma „free“ cortisol arising from acute stress in sheep. *Austr. Vet. J.* 62: 403–406
- HAY, M.; MORMÈDE, P. (1998): Urinary excretion of catecholamines, cortisol and their metabolites in Meishan and Large White sows: validation as a non-invasive and integrative assessment of adrenocortical and sympathoadrenal axis activity. *Vet. Res.* 29: 119–128
- LADWIG, J. (1994): Streß. In: DÖCKE, F. (Hrsg.) *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena – Stuttgart: 377–398
- LADWIG, J.; STRIBRNY, K. (1988): A simplified method for stress free continuous blood collection in large animals. *Lab. Anim. Sci.* 38: 333–335
- LINDNER, H.R. (1972): Enterohepatic circulation and patterns of urinary excretion of cortisol metabolites in the ewe. *J. Endocrinol.* 52: XIX–XX
- MACDONALD, I.A.; BOKKENHEUSER, V.D.; WINTER, J.; MCLERNON, A.M.; MOSBACH, E.H. (1983): Degradation of steroids in the human gut. *J. Lip. Res.* 24: 675–700
- MERL, S.; SCHERZER, S.; PALME, R.; MÖSTL, E. (2000): Pain causes increased concentrations of glucocorticoid metabolites in equine faeces. *J. Equine Vet. Sci.* 20: 586–590
- MÖSTL, E.; MEßMANN, S.; BAGU, E.; ROBIA, C.; PALME, R. (1999): Measurement of glucocorticoid metabolite concentrations in faeces of domestic livestock. *J. Vet. Med. A* 46: 621–632
- MÖSTL, E., MAGGS, J.L., SCHRÖTTER, G., BESENFELDER, U., PALME, R. (2001): Measurement of cortisol metabolites in faeces of ruminants. *Vet. Res. Commun.* (in press)
- 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
- PALME, R.; MÖSTL, E. (1997): Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. *Int. J. Mammal. Biol.* 62, Suppl. II: 192–197
- PALME, R.; ROBIA, C.; BAUMGARTNER, W.; MÖSTL, E. (2000): Transport stress in cattle as reflected by an increase in faecal cortisol metabolites. *Vet. Rec.* 146: 108–109



- PALME, R.; ROBIA, C.; MEßMANN, S.; HOFER, J.; MÖSTL, E. (1999): Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminants: A non-invasive parameter of adrenocortical function. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 86: 237–241
- SCHATZ, S.; PALME, R. (2001): Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: A non-invasive method for evaluating adrenocortical function. *Vet. Res. Commun.* 25: 271–287
- SCHÖNREITER, S.; HUBER, H.; LOHMÜLLER, V.; ZANELLA, A.J.; UNSHELM, J.; HENKE, J.; ERHARDT, W. (1999): Speichelkortisol als Streßparameter bei Saugferkeln. *Tierärztl. Prax.* 27: 175–179
- TAYLOR, W. (1971): The excretion of steroid hormone metabolites in bile and faeces. *Vitam. Horm.* 29: 201–285
- TERLOUW, E.M.C.; SCHOUTEN, W.G.P.; LADEWIG, J. (1997): Physiology. In: APPLEBY, M.C.; HUGHES, B.O. (eds). *Animal welfare*. CAB International, University Press, Cambridge: 143–158
- TESKEY-FERSTL, A.; STEINECK, TH.; BAMBERG, E.; PALME, R. (2000): Excretion of corticosteroids in urine and faeces of hares (*Lepus europaeus*). *J. Comp. Physiol. B* 170: 163–168
- THIELSCHER, H.H.; SCHWARZE, N.; LADEWIG, J. (1999): Blutentnahme und Medikamentenverabreichung bei landwirtschaftlichen Nutztieren mit Darstellung eines mobilen Systems. *Tierarzt.-Umschau* 54: 277–282
- VERKERK, G.A.; PHIPPS, A.M.; CARRAGHER, J.F.; MATTHEWS, L.R.; STELWAGEN, K. (1998): Characterization of milk cortisol concentrations as a measure of short-term stress responses in lactating dairy cows. *Anim. Welfare* 7: 77–86

A. Univ. Prof. Dr. Rupert Palme und A. Univ. Prof. Dr. Erich Möstl, Institut für Biochemie und Ludwig-Boltzmann Institut für veterinärmedizinische Endokrinologie, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien