

Aus dem Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut  
und  
der Klinik für Vögel und Reptilien  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Morphologische und immunzytochemische Charakterisierung  
der Gonaden männlicher Papageienvögel**

Inaugural-Dissertation  
Zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Susanne Reitemeier, geb. Schneider  
aus Saarbrücken

Leipzig, 2014

**Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig**

**Dekan:** Prof. Dr. Manfred Coenen

**Betreuer:** Prof. Dr. Almuth Einspanier

Prof. Dr. Maria-Elisabeth Krautwald Junghanns

**Gutachter:** Prof. Dr. Almuth Einspanier

Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut

der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Maria-Elisabeth Krautwald-Junghanns

Klinik für Vögel und Reptilien

der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Katarina Jewgenow

Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung Berlin

**Tag der Verteidigung:** 10.12.2013

MEINEM MANN UND UNSEREN BEIDEN KINDERN

## INHALTSVERZEICHNIS

1	<b>EINLEITUNG</b>	1
2	<b>LITERATURÜBERSICHT</b>	3
2.1	<b>Die Ordnung der Papageienvögel (<i>Psittaciformes</i>)</b>	3
2.1.1	Systematik	3
2.1.2	Arterhaltung und Zucht in menschlicher Obhut	3
2.1.3	Der Wellensittich ( <i>Melopsittacus undulatus</i> ) als Modellspezies	5
2.2	<b>Männliche Gonaden</b>	6
2.2.1	Makroskopische Anatomie von Hoden und Nebenhoden	6
2.2.1.1	Hoden ( <i>Testis</i> )	6
2.2.1.2	Nebenhoden ( <i>Epididymis</i> )	6
2.2.2	Ultrastruktureller Aufbau von Hoden und Nebenhoden	7
2.2.2.1	Interstitialgerüst des Hodens	7
2.2.2.2	Samenkanälchen ( <i>Tubuli seminiferi convoluti</i> )	8
2.2.2.3	Hodennetz ( <i>Rete testis</i> )	8
2.2.2.4	Nebenhoden ( <i>Epididymis</i> )	8
2.2.3	Saisonale Veränderungen von Hoden und Nebenhoden	9
2.2.4	Endokrine Steuerung der Hodenfunktion	9
2.2.4.1	Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf die Hodenfunktion	9
2.2.4.2	Photoperiodik und Hodenaktivität	10
2.2.4.3	Die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse	10
2.3	<b>Techniken zur Einordnung des Reproduktionsstatus beim männlichen Papageienvogel</b>	12
2.3.1	Makroskopische Beurteilung der Hoden mittels Endoskopie	12
2.3.2	Histologische und zytologische Beurteilung von Hodenbioptaten	13
2.3.3	Endokrine Analyse von Blut und Kot	14
2.3.4	Immunzytochemische Beurteilung von Hodengewebe	15
2.4	<b>Ausgewählte Marker für die immunzytochemische Untersuchung des Hodens</b>	16
2.4.1	Steroidhormonrezeptoren	16
2.4.1.1	Androgenrezeptor (AR)	16
2.4.1.2	Östrogenrezeptoren (ER $\alpha$ , ER $\beta$ )	16

## INHALTSVERZEICHNIS

---

2.4.1.3	Progesteronrezeptor (PR)	17
2.4.2	Steroidogene Enzyme	17
2.4.2.1	Aromatase (ARO)	17
2.4.2.2	3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD)	18
2.4.2.3	17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen 1, 2 und 7 (17 $\beta$ -HSD-1, -2 und -7)	18
2.4.3	Relaxinpeptid-Familie	18
2.4.3.1	Relaxin (RLN)	19
2.4.3.2	Relaxin-like factor (RLF)	19
2.4.3.3	Rezeptoren für Relaxin und Relaxin-like factor: RXFP1 und RXFP2	19
2.4.4	Proliferationsmarker	20
2.4.4.1	Ki67	20
2.4.4.2	Aktin (Smooth Muscle Actin, SMA)	20
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>21</b>
3.1	<b>Publikation 1: Evaluating the reproductive status of the male budgerigar (<i>Melopsittacus undulatus</i>)</b>	<b>21</b>
3.2	<b>Publikation 2: Antibody selection for immunocytochemical characterization of the male reproductive system in <i>Psittaciformes</i></b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b>	<b>I</b>
8.1	<b>Weitere Publikationen</b>	<b>I</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ASA	Antisperm-Antibodies
AR	Androgenrezeptor
ARO	Aromatase
BrdU-Färbung bzw.	5-bromo-2-deoxyuridin-Färbung beziehungsweise
CITES	Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora
d. h.	das heißt
ER	Östrogenrezeptor
ER $\alpha$	Östrogenrezeptor $\alpha$
ER $\beta$	Östrogenrezeptor $\beta$
et al.	et alii (und Mitarbeiter)
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
17 $\beta$ -HSD	17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
INSL	Insulin-like Peptid
IUCN	International Union for Conservation of Nature and Natural Resources
LGR	Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor
LH	Luteinisierendes Hormon
Mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
N	Anzahl
PR	Progesteronrezeptor
%	Prozent
RLF	Relaxin-like factor
RLN	Relaxin
RXFP	Relaxin Family Peptide Receptor
SER	Smooth endoplasmic reticulum (glattes, endoplasmatisches Retikulum)
SMA	Smooth-muscle actin
z. B.	zum Beispiel

## 1 EINLEITUNG

Die ständig wachsende Bedrohung wildlebender Papageienpopulationen und der damit verbundene dramatische Rückgang vieler Arten erfordert mehr denn je intensive und zielgerichtete Schutzmaßnahmen. Der Anteil an bedrohten, gefährdeten, aber auch in freier Natur bereits ausgestorbenen Spezies ist in der Ordnung der *Psittaciformes* weltweit sehr hoch (BirdLife International 2013, IUCN 2013). Einer der Hauptgründe hierfür ist die anhaltende Lebensraumzerstörung, wie etwa durch Brandrodung, illegalen Holzeinschlag oder zunehmende Besiedelung. Viele endemische Arten werden dadurch in ihrem ohnehin kleinen Verbreitungsgebiet immer weiter eingeschränkt. Eingeschleppte Fressfeinde und Nahrungskonkurrenten sowie die Vernichtung ursprünglicher Futterpflanzen tragen ebenfalls zur Einengung der Habitate bei. Eine ernstzunehmende Bedrohung stellt außerdem der internationale Vogelhandel dar, der noch immer "Wildfänge" anbietet und somit die illegale Entnahme seltener Arten aus der Natur unterstützt (WÜST 2012).

Laut Informationen der Vereinten Nationen aus dem Jahr 2010 sind 17.000 Pflanzen- und Tierarten vom Aussterben bedroht (United Nations 2010) und bis heute hält dieser Trend an (United Nations 2013). Auch ein Drittel aller Papageien sind davon betroffen. Als eindrucksvolles Beispiel gelten Neuweltpapageien wie der Spixara (*Cyanopsitta spixii*) und die Königsamazonen (*Amazona guildingii*), von denen nur noch wenige Individuen in Menschenobhut überlebt haben (LIERZ et al. 2013). Zahlreiche Artenschutzprogramme existieren bereits, die im natürlichen Verbreitungsgebiet der Papageien um eine Verbesserung der politischen und sozialen Situation bemüht sind. Es bestehen aber auch seit Jahren intensive Bemühungen, bedrohte Arten in Menschenobhut zu reproduzieren und zu erhalten (HAMMER und WATSON 2012). Die effektive Zucht dieser Tiere setzt eine eindeutige und aussagekräftige Einordnung der Reproduktionsaktivität voraus. Zur Beurteilung der Geschlechtsorgane der *Psittaciformes* sind Kenntnisse über Anatomie, Physiologie und Pathologie erforderlich.

Hinsichtlich der Charakterisierung des Fortpflanzungsstatus von Psittaziden wurden in erster Linie Daten bei Spezies erhoben, die die IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) als „in der Natur nicht gefährdet“ einstuft. Hier ist der Wellensittich eines der am häufigsten untersuchten Modelltiere (HÄNSE et al. 2008, HUMPHREYS 1975, POHL-APEL et al. 1982, SAMOUR et al. 1987). Die derzeit vorliegenden Studien zur Ermittlung der Reproduktionsaktivität bei männlichen Papageienvögeln beschäftigen sich vorwiegend mit der makro- und mikroskopischen Morphologie der Hoden (GARTRELL 2002, HÄNSE et al. 2008, HUMPHREYS 1975, PEIXOTO et al. 2012, SAMOUR et al. 1987) sowie mit der Messung peripherer

Steroidhormonspiegel (HAHN et al. 2011). Der Nachweis lokaler Steroidogenese in den Zellen der Gonaden mittels immunzytochemischer Untersuchungen gelang bislang jedoch nicht. Beim Wirtschaftsgeflügel hingegen gilt die endokrinologische Reproduktionsanalytik aufgrund des kommerziellen Interesses als gut etabliert (DORNAS et al. 2008, MADEKUROZWA et al. 2002, OLIVEIRA et al. 2011). Bedauerlicherweise ist ein einfacher Transfer auf die *Psittaciformes* zu deren Artenschutz nicht möglich, da aus phylogenetischer Sicht keine engen Verwandtschaftsbeziehungen bestehen (SUH et al. 2011).

Vor diesem Hintergrund beschäftigt sich die vorliegende Arbeit, die auf der histologischen und immunzytochemischen Untersuchung fixierter Reproduktionsorgane männlicher Papageienvögel basiert, mit den folgenden Fragestellungen:

1. Ist die morphologische Beurteilung fixierter, männlicher Gonaden der psittaziformen Modellspezies Wellensittich ausreichend, um eine Aussage über die Fortpflanzungsaktivität zu treffen?
2. Können an Hodengewebe der Modellspezies Wellensittich immunzytochemische Marker zur Charakterisierung der Reproduktionsstatus etabliert werden?
3. Sind diese etablierten Methoden auf andere Papageienspezies übertragbar?
4. Sind die mit Hilfe der immunzytochemischen Analysen am Modelltier Wellensittich erzielten Ergebnisse auf andere Papageienspezies übertragbar?
5. Welche spezies-spezifischen Unterschiede sind erkennbar?
6. Welche immunzytochemischen Marker eignen sich am besten zur Beurteilung der Fortpflanzungsaktivität der jeweiligen Papageienspezies?

Die Etablierung reproduktionsrelevanter, immunzytochemischer Marker bei männlichen Papageienvögeln dient der Erweiterung des Kenntnisstandes über die Fortpflanzungsbiologie dieser Vogelordnung, vor allem im Hinblick auf physiologische Abläufe in den Gonaden und deren lokale Hormonproduktion. Die Promotionsarbeit soll so die Grundlage für weitere Forschungsansätze bezüglich peripherer Hormonanalysen und künstlicher Besamung bei den *Psittaciformes* liefern. In erster Linie könnten die etablierten Marker in Analyse-Systemen zum Einsatz kommen, die nicht-invasiv gewonnene Medien (z. B. Faezes) untersuchen. Dies würde die Etablierung der Reproduktionsdiagnostik bedrohter Arten unterstützen und eine sinnvolle Ergänzung von Züchterhaltungsprogrammen darstellen.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Die Ordnung der Papageienvögel (*Psittaciformes*)

#### 2.1.1 Systematik

Die *Psittaciformes* bilden eine große und vielfältige Ordnung innerhalb der Klasse der Vögel (Aves). Die Ordnung besteht aus über 370 Spezies, eingestuft in etwa 70 Gattungen, deren Großteil in den tropischen Gebieten der südlichen Hemisphäre beheimatet ist (CHRISTIDIS et al. 1991, HOMBERGER 2006). Charakteristische Merkmale der Papageienvögel sind zum einen der kräftige, gekrümmte Schnabel, der gelenkartig mit dem Schädel verbunden ist und zum anderen die besondere Zehenstellung der Füße (Zygodaktylie). Hierbei sind die zweite und dritte Zehe nach vorn, die erste und vierte Zehe nach hinten gerichtet. Die Größe der Vögel variiert von neun Zentimeter bis zu einem Meter. Sie zeichnen sich durch ihr farbenfrohes Gefieder, ihre lebenslange Lernfähigkeit und ihr Sprachvermögen aus.

Hinsichtlich der Taxonomie der Papageien existiert Uneinigkeit, vor allem die Einordnung der Neuseeland-Papageien betreffend (HOMBERGER 2006, SIBLEY und AHLQUIST 1990). Aufgrund neuer phylogenetischer Untersuchungen gilt die Aufteilung in drei Familien: *Strigopidae*, *Cacatuidae* und *Psittacidae* (CHRISTIDIS und BOLES 2008, LIVEZEY und ZUSI 2007). Die Familie der *Strigopidae* beinhaltet die neuseeländischen Gattungen *Nestor* und *Strigops*, denen unter anderem der Kea (*Nestor notabilis*) und der Kakapo (*Strigops habroptilus*) zugehörig sind.

Davon abzugrenzen sind die Kakadus (*Cacatuidae*), die sich von den beiden anderen Papageienfamilien unter anderem durch Merkmale wie eine aufrichtbare Haube sowie das Fehlen der für den Blau- und Grünschimmer verantwortlichen Federtextur unterscheiden (HIGGINS 1999, ROWLEY und COLLAR 1997).

WRIGHT et al. (2008) unterteilen die Familie der *Psittacidae* in zwei große Kladen, die Neuweltpapageien (*Arini*) und eine umfassende, bisher unbekante Klade der Altweltpapageien. Zu diesen zählen die Loris (*Loriinae*), Plattschweifsittiche (*Platyercini*) sowie alle übrigen Arten.

#### 2.1.2 Arterhaltung und Zucht in menschlicher Obhut

Weltweit gelten die *Psittaciformes* als die Vogelordnung mit der größten Anzahl an bedrohten Spezies. Laut der IUCN besitzen annähernd 30 % der Papageienvögel einen Gefährdungsstatus. Die Bedrohung wildlebender Arten der Ordnung *Psittaciformes* nimmt

aufgrund der Zerstörung ihrer Habitate und des illegalen Handels mit Wildfängen kontinuierlich zu (BirdLife International 2013, IUCN 2013, WATERHOUSE 2006). International werden Maßnahmen zur Arterhaltung in der Natur sowie Zuchtprogramme mit dem Ziel der Bestandsaufstockung durchgeführt (ROBILLER 2001).

Die erfolgreiche Zucht in menschlicher Obhut kann die Effektivität von Programmen zur Wiederherstellung wildlebender Papageienpopulationen steigern (YAMAMOTO et al. 1989). Selbst für erfahrene Züchter bedeutet dies eine Herausforderung, da standardisierte Zuchtmethoden beim Ziervogel nach wie vor fehlen und die Reproduktionserfolge im Vergleich zum Nutzgeflügel als mäßig einzustufen sind (HATT 2007).

Ideale Umgebungsbedingungen wie Beleuchtung, Klima, Ernährung und das Angebot geeigneter Nistplätze sind essentiell für eine erfolgreiche Nachzucht. Darüber hinaus müssen bei den zu verpaarenden Individuen Erkrankungen des Reproduktionstraktes ausgeschlossen werden. Die korrekte Verpaarung monomorpher Arten, der Eintritt der Geschlechtsreife und das speziesspezifische Reproduktionsverhalten gelten zudem als wichtige Einflussfaktoren (JOYNER 1994). Obwohl generell die natürliche Brut vorzuziehen ist, kann auch die künstliche Bebrütung der Eier unter bestimmten Umständen, beispielsweise zur Steigerung der Anzahl an Nachkommen, erforderlich sein (HATT 2007). Auch hier sind zur Erzielung von Zuchterfolgen zahlreiche Anforderungen, wie z. B. Temperatur, Luftfeuchte und das Wenden der Eier während der Inkubation zu beachten (JOYNER 1994).

Abgesehen von den bereits genannten Faktoren stellt die eingeschränkte genetische Vielfalt bedrohter Arten in Menschenobhut noch immer ein schwerwiegendes Problem dar. Oftmals gehen diese Populationen auf relativ kleine Wildpopulationen zurück. DANIELL und MURRAY (1986) empfehlen jedoch eine Mindestpopulationsgröße von 50 Tieren, um die negativen Auswirkungen auf Population und Reproduktion infolge von Inzucht gering zu halten. Viele Zuchttiere in Artenschutzprogrammen sind aufgrund genetischer Aspekte zwangsverpaart. Die Folge dessen sind oftmals unbefruchtete Gelege aufgrund fehlender Paarbindung (NEUMANN et al. 2013).

Neben der Zwangsverpaarung ist häufig auch Infertilität bei den männlichen Tieren Ursache für ausbleibende Zuchterfolge. Reproduktionsstörungen beim männlichen Papageienvogel können auf Verwachsungen, Entzündungen oder Neoplasien des Hodens zurückzuführen sein. Sie werden aber auch durch abnormale Verhaltensweisen verursacht, wie z. B. die Prägung einer Handaufzucht auf den Menschen und des gestörten Fortpflanzungsverhaltens dieses Vogels gegenüber dem Partner der eigenen Spezies. Klinisch deutlich schwieriger zu fassen sind funktionelle Störungen in der hormonellen Steuerung der Hodenfunktion (JOYNER 1994), zumal die endokrinologische Reproduktionsanalytik beim Papageienvogel kaum etabliert ist.

Die Zuchtverfahren bei Papageien beruhen grundsätzlich auf der natürlichen Fortpflanzung (HATT 2007), jedoch gibt es zunehmend Bestrebungen, die künstliche Besamung auch bei dieser Vogelordnung zu etablieren. Dies wäre vor allem bei bedrohten Arten hilfreich, bei denen nur eine begrenzte Anzahl an Individuen existiert und Verpaarungsprobleme, krankheits- oder verhaltensbedingt gestörte Fertilität und geographische Distanzen zwischen den zu verpaarenden Individuen im Vordergrund stehen (BLANCO et al. 2009, JOYNER 1994). Bisher existieren Einzelnachweise über erfolgreiche künstliche Besamungen bei der Blaukronenamazone (BROCK 1991), beim Wellensittich (SAMOUR 2002), Nymphensittich (NEUMANN et al. 2013), Grünflügelara, Rotsteiðkakadu, Scharlachkopfpapagei sowie diversen Edelpapageienarten (LIERZ et al. 2013).

### **2.1.3 Der Wellensittich (*Melopsittacus undulatus*) als Modellspezies**

Die systematische Eingliederung dieses kleinen Papageienvogels erfolgt als einzige Art in die Gattung *Melopsittacus* GOULD, 1840. Diese ist benannt nach John Gould, der im Jahr 1840 erstmals lebende Wellensittiche nach Europa einführte. Die monotypische Gattung wird heute der Gattungsgruppe der Plattschweifsittiche (*Platyercini*) innerhalb der Unterfamilie *Psittacinae* unterstellt. Der Wellensittich gehört somit zu den Eigentlichen Papageien (*Psittacidae*) (FORSHAW 2006, ROBILLER 2001, ROWLEY und COLLAR 1997). Es existieren zahlreiche Gründe dafür, Wellensittiche als Tiermodell für die Untersuchung der psittaziformen Reproduktion heranzuziehen. Dank hoher Fruchtbarkeit und schneller Generationsfolge gelten sie als ideale Zuchttiere. Die Haltung der zierlichen Vögel ist vergleichsweise unkompliziert, sie sind widerstandsfähig und einfach im Umgang. Zahlreiche Papageienspezies besitzen keinen Geschlechtsdimorphismus, wohingegen männliche und weibliche Wellensittiche anhand ihrer Wachshautfärbung (Hahn blau, Henne bräunlich) unterschieden werden können (LAMBERT und REINSCHMIDT 2006, LANTERMANN 1999a, ROBILLER 2001). Im Gegensatz zu anderen *Psittaciformes* sind Wellensittiche nicht in den Appendizes I und II des Washingtoner Artenschutzabkommens gelistet und unterliegen daher keinen besonderen Schutzmaßnahmen bzw. Handelsbeschränkungen (CITES 2012). Die IUCN ordnet ihnen den Gefährdungsstatus „Least Concern“ (in der Natur nicht gefährdet) zu (IUCN 2013).

Der Wellensittich gehört heute zu den beliebtesten Haustieren und ist der am häufigsten gehaltene Papageienvogel in menschlicher Obhut (LANTERMANN 1999a). Im Klinikalltag ist er daher weitaus häufiger anzutreffen als andere Papageienspezies. Dies ist auch der Grund dafür, dass im Rahmen von Routinesektionen ausreichend Organmaterial von Wellensittichen für wissenschaftliche Untersuchungen verfügbar ist.

## 2.2 Männliche Gonaden

### 2.2.1 Makroskopische Anatomie von Hoden und Nebenhoden

#### 2.2.1.1 Hoden (Testis)

Die paarig angelegten Hoden liegen im Eingeweidebauchfellsack am kranialen Pol der Nieren und kaudal der Nebennieren. Die mediale Begrenzung bilden Aorta, kaudale Hohlvene und die abdominalen Luftsäcke (O'MALLEY 2005). Die Gonaden sind von einer einschichtigen Serosaschicht (*Epiorchium*) überzogen und mit einer kurzen Serosadoppellamelle (*Mesorchium*) an der Dorsalwand der Leibeshöhle befestigt (WAIBL und SINOWATZ 1992). Ihre Form, Farbe und Größe variiert stark unter dem Einfluss von Alter, Spezies, jahreszeitlichen Klimaschwankungen und dem aktuellen Fortpflanzungsstadium (KÖNIG et al. 2009). Inaktive Hoden sind meist klein, bohnenförmig und von gelb-brauner Farbe, bei Jungtieren erscheinen sie eher abgeflacht und spitz (JOYNER 1994). Reife, aktive Gonaden vergrößern sich erheblich. Bei wildlebenden Wellensittichen beispielsweise erhöht sich ihr Gewicht um das 30-40-Fache (POHL-APEL et al. 1982). Dies ist das Resultat einer Zunahme von Länge und Durchmesser der Samenkanälchen sowie einer erhöhten Anzahl von Leydig-Zellen (BOWLES 2006). Die Hodengröße verändert sich außerdem in Abhängigkeit von Brutverhalten, Paarungssystem, Gelegegröße sowie geografischer Lage des Lebensraumes (PITCHER et al. 2005). In der Fortpflanzungsperiode wirken die Hoden eher rund und blass weiß, die Gefäßzeichnung auf der Serosa wird aufgrund der stärkeren Durchblutung intensiver. Bedingt durch die Einlagerung von Melanozyten im Interstitium weisen einige Papageienspezies, z. B. Goldsittich (*Guaruba guarouba*), Gelbbrustara (*Ara ararauna*), vor allem aber zahlreiche Kakaduarten (*Cacatua spp.*) schwarz-braun gefärbte Gonaden auf (JOYNER 1994). Im aktiven Zustand verblassen diese jedoch aufgrund der Ausdehnung der Samenkanälchen und des geringeren Anteils an Melanin-tragendem Interstitium (OROSZ 1997).

#### 2.2.1.2 Nebenhoden (Epididymis)

Der Nebenhoden befindet sich dorsomedial des Hodens. Bei einigen Spezies existiert ein Fortsatz, der sich nach kranial bis zur Nebenniere erstreckt. Lagebedingt ist der Nebenhoden während der reproduktionsaktiven Phase laparoskopisch kaum darstellbar, da er durch die erheblich an Größe zunehmenden Hoden verdeckt ist (JOYNER 1994, HÄNSE 2012). Eine Unterteilung in Kopf, Körper und Schwanz, wie sie beim Säugetier vorgenommen wird, fehlt (BOWLES 2006).

Der Nebenhoden gilt laut WAIBL und SINOWATZ (1992) als Ort der Speicherung, Reifung und Ernährung von Spermien. O'MALLEY (2005) hingegen geht davon aus, dass die

Spermienreifung bei Vögeln erst im Samenleiter (*Ductus deferens*) erfolgt. Weitere Autoren benennen als Speicherort für die Samenzellen den Samenleiter (LAKE 1957) bzw. das *Urodæum* der Kloake (JOYNER 1994). Die Funktion des Nebenhodens wird eher in der Anreicherung des Ejakulates mit Lipoiden, Proteinen und Polysacchariden gesehen (LAKE 1957). Er produziert Sekrete, die die Reifung der Spermien fördern sowie deren Motilitätspotential und Geschwindigkeit steigern (BIRKHEAD 1998). Da beim Vogel die akzessorischen Geschlechtsdrüsen fehlen (O'MALLEY 2005), wird das Seminalplasma hauptsächlich von kinezilientragenden Zellen des Nebenhodens und der samenableitenden Wege produziert (LAKE 1957, LAKE und MCINDOE 1959). Hinzu kommen Transsudate der Lymphfalten und der Gefäßkörper (*Corpora vascularia*) der Kloake (WAIBL und SINOWATZ 1992).

### **2.2.2 Ultrastruktureller Aufbau von Hoden und Nebenhoden**

Der Hoden ist umgeben von einer dünnen Bindegewebsschicht (*Tunica albuginea*), in die vereinzelt glatte Muskelzellen eingelagert sind. Im Gegensatz zu den Säugetieren existieren weder eine erkennbare Septierung des Hodenparenchyms, noch ein *Mediastinum testis* (KÖNIG et al. 2009). Die Hauptfunktionen des Hodens, nämlich die Spermiogenese und die Bildung von Androgenen, spiegeln sich in dessen ultrastrukturellem Aufbau wider. Er besteht aus zwei Arten von Parenchym: dem Keimepithel und dem Interstitialgerüst (KIRBY und FROMAN 2000), auf die im Folgenden eingegangen werden soll.

#### **2.2.2.1 Interstitialgerüst des Hodens**

Ausgehend von der Hodenkapsel ziehen feine Bindegewebszüge in das Hodeninnere, wo sie Fasernetze bilden. Darin eingebettet liegen die Samenkanälchen, zwischen denen die sogenannten Leydig-Zellen (*Cellulae interstitiales*) zu finden sind (KÖNIG et al. 2009). Sie sind gemeinsam mit Blutgefäßen sowie saison- und speziesabhängig vorkommenden Melanozyten in die Bindegewebsräume eingelagert. Bei juvenilen Tieren sind die Leydig-Zellen eher polygonal. Somit wirkt ihre Anzahl größer als bei adulten Vögeln, wo sie infolge der Ausdehnung der Samenkanälchen ein fibrozytenähnliches Erscheinungsbild annehmen und weniger auffällig sind (MICHEL 1993). Das in hoher Konzentration im Zytoplasma der Leydig-Zellen vorkommende glatte endoplasmatische Retikulum (SER) ist in die Steroidhormonsynthese aus Cholesterol involviert. Unter dem Einfluss von LH produzieren Leydig-Zellen die Hauptandrogene Testosteron und Androstendion (LAKE 1981, OROSZ 1997).

### 2.2.2.2 Samenkanälchen (*Tubuli seminiferi convoluti*)

Eingebettet im lockeren Bindegewebe des Interstitiums liegen die stark geschlängelten Samenkanälchen, die im Gegensatz zum Säuger miteinander anastomosieren. Ihre Wand bilden die *Membrana propria* und das Keimdrüsenepithel (*Epithelium spermatogonicum*). Die *Membrana propria* setzt sich aus Basalmembran und lockerem, elastischem Bindegewebe mit eingelagerten kontraktilen Zellen zusammen (KÖNIG et al. 2009). Der Aufbau des Keimepithels ähnelt weitgehend dem der Mammalia. Im Stadium der sexuellen Ruhephase ist bei juvenilen und adulten Vögeln ein einschichtiger Epithelverband aus Spermatogonien und Sertoli-Zellen (*Cellulae sustentaculares*) ausgebildet. Beide Zelltypen sitzen dabei innen auf der Basalmembran. Mit dem Eintritt in die Geschlechtsreife finden sich zwischen den Zytoplasma-Ausläufern der Sertoli-Zellen eingebettet zahlreiche Spermiovorstufen (Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatiden) und reife Spermien, deren Schwänze lumenwärts zeigen („Samenährenstruktur“) (HUMMEL 2000, MICHEL 1993). Somit wird das Keimepithel im Stadium der sexuellen Aktivität mehrschichtig. Form, Ultrastruktur und das histochemische Verhalten der Sertoli-Zellen deuten auf eine unterstützende Funktion bei der Spermatogenese hin. Sie sezernieren zudem nutritive Stoffe und sind phagozytotisch aktiv. Es wird vermutet, dass sie Testosteron binden können und wie Leydig-Zellen in der Lage sind, Steroidhormone zu produzieren. Die reifen Spermien gelangen aus den *Tubuli seminiferi convoluti* entweder direkt oder unter Zwischenschaltung der kurzen, gestreckten Samenkanälchen (*Tubuli seminiferi recti*) in das Hodennetz (MICHEL 1993, OROSZ 1997).

### 2.2.2.3 Hodennetz (*Rete testis*)

Das *Rete testis* bildet ein Netzwerk aus in Bindegewebe eingebetteten Kanälchen. Es liegt dorsomedial des Hodens, an den Nebenhoden angrenzend. Sowohl die gestreckten Samenkanälchen als auch das Hodennetz sind von Sertoli-Zellen gesäumt (BOWLES 2006). Das *Rete testis* hat intratestikuläre, intrakapsuläre und extratestikuläre Anteile und ist von einem einfachen platten bis hochprismatischen Epithel ausgekleidet (AIRE 1982).

### 2.2.2.4 Nebenhoden (*Epididymis*)

Der Nebenhoden bildet eine Aneinanderreihung von Gängen, die letztlich im Samenleiter münden. Die Nebenhodengänge umfassen das extratestikuläre Hodennetz (*Rete testis*), *Ductuli efferentes* und *conjungentes* sowie den Nebenhodengang (*Ductus epididymidis*) (KIRBY und FROMAN 2000). Auf der gesamten Länge des Hodens treten *Ductuli efferentes* in den Nebenhoden über. *Ductuli efferentes* und *conjungentes* besitzen ein aus ziliotragenden und zilienfreien (Typ I und II) Zellen bestehendes Epithel. Bei den ziliotragenden Zellen ist der Zellkern apikal, bei den zilienfreien eher basal lokalisiert

(AIRE 1980). Der Nebenhodengang hingegen ist mit einem Epithel aus zilienfreien (Typ III) Zellen (auch Hauptzellen) ausgekleidet (AIRE 1979, TINGARI 1971). Das peritubuläre, lockere Bindegewebe ist durchzogen von einem dichten Kapillarnetzwerk und glatten Muskelzellen (KIRBY und FROMAN 2000).

### **2.2.3 Saisonale Veränderungen von Hoden und Nebenhoden**

Bei zahlreichen Vogelspezies treten saisonale Reproduktionszyklen auf. Die zyklischen Variationen der Geschlechtshormone sind verbunden mit strukturellen Veränderungen im Hoden, vor allem im Zellverband des Keimepithels (FRAISSINET et al. 1987). Vögel mit ausgeprägten Brutzyklen besitzen drei definierte Phasen der Hodenaktivität: Akzeleration (beginnende Keimzellaktivität), Kulmination (Höhepunkt der Keimzellaktivität mit maximaler Spermienproduktion) und Regeneration (Ruhephase) (LOFTS und MURTON 1973). Obwohl die Stadieneinteilung des Keimepithelzyklus bei *Psittaciformes* in Abhängigkeit von Autor und Spezies variiert (GARTRELL 2002, HUMPHREYS 1975, MAITRA und DEY 1992, POHL-APEL et al. 1982, SAMOUR et al. 1987, SMITH und BRERETON 1976), basieren all diese Studien letztlich auf dem Vorhandensein, der Morphologie und der Teilungsaktivität der Keimzellstadien. Die Hoden juveniler Tiere werden oftmals mit der Ruhephase adulter Tiere gleichgesetzt (LAKE 1981). Bei Wellensittichen konnte allerdings gezeigt werden, dass das Keimepithel bei Jungtieren nur aus einer Lage Spermatogonien besteht, während adulte Tiere zwei bis drei Zelllagen aufweisen (POHL-APEL et al. 1982).

Auch im Nebenhoden treten während der unterschiedlichen Phasen des Reproduktionszyklus strukturelle Veränderungen in den zilienfreien Epithelzellen (Typ III oder Hauptzellen) von extratestikulärem Hodennetz, Ductuli conjugentes und Nebenhodengang auf. In der sexuellen Ruhephase kommt es zum Schrumpfen des Epithels, zur Verringerung der Ganglumina und einem Absinken der sekretorischen Aktivität (AIRE 2002a).

### **2.2.4 Endokrine Steuerung der Hodenfunktion**

Die hormonelle Regulation der Reproduktion beim Vogel ist teilweise noch ungeklärt. Hinsichtlich der Reproduktionsendokrinologie wurden Unterschiede zwischen Vogel und Säugetier, aber auch zwischen verschiedenen Vogelspezies nachgewiesen (DAWSON und SHARP 2007). Dennoch geht man davon aus, dass die Hodenfunktion ähnlich zum Säuger über die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse gesteuert wird (O'MALLEY 2005).

#### **2.2.4.1 Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf die Hodenfunktion**

Das zentrale Nervensystem des Vogels reagiert unterschiedlich empfindlich auf Umwelteinflüsse. Saisonale Variationen in Hodengröße und -aktivität sind in erster Linie an

sogenannte Photoperioden, d. h. den Jahresgang der Tageslichtdauer, gekoppelt (GARTRELL 2002, GWINNER 1989). Obwohl die Schwankungen der Tageslichtdauer in den Tropen viel geringer ausgeprägt sind als in den gemäßigten Breiten, zeigen sogar tropische Vögel saisonale Variationen der Hodenfunktion in Abhängigkeit von der Photoperiodik (HAU 2001, PEIXOTO et al. 2012). Bei den hauptsächlich in den Tropen und Subtropen beheimateten Papageien (LANTERMANN 1999b) existieren neben der Tageslichtlänge weitere bedeutende Auslöser der Reproduktionsaktivität. Klimatische Bedingungen (Temperatur, Regen), aber auch soziale Gegebenheiten (Hör- und Sichtkontakt zum anderen Geschlecht, Verfügbarkeit von Nistplätzen) sowie Futterangebot und Ernährungszustand beeinflussen die hormonelle Stimulation der Gonaden (DAWSON und SHARP 2007, POHL-APEL 1980). Außerdem spielen auch endogene zirkannuale Rhythmen eine Rolle, die genetisch vorprogrammiert sind und von jahreszeitlich schwankenden Umweltfaktoren synchronisiert werden (GWINNER 1989).

### **2.2.4.2 Photoperiodik und Hodenaktivität**

Vögel erkennen eine Zunahme der Tageslichtlänge über einen Pulsgenerator, der im vorderen Hypothalamus lokalisiert ist. Hier übersetzen extraretinale Photorezeptoren eingehende Lichtsignale in neuronale Impulse und triggern die Freisetzung von Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) (DAWSON et al. 2001). Der Pulsgenerator ist nur in der Phase der erhöhten Photosensitivität für Lichtsignale empfänglich. Bei einem langen Lichttag fällt diese Phase mit der Lichtperiode zusammen und das Hodenwachstum wird über die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse stimuliert. Bei einem kurzen Lichttag wird der Generator nicht stimuliert, da er während des Lichteinfalls nicht photosensitiv ist (GERSTBERGER 2009). Die Überschreitung der Tageslichtlänge führt zu einer Hemmung der GnRH-Freisetzung, unter anderem vermittelt durch Prolaktin und Schilddrüsenhormone (DAWSON et al. 2001). In dieser photorefraktären Phase, die speziesspezifisch unterschiedlich lange anhält, kommt es zur Gonadenregression. Bei Wellensittichen beispielsweise dauert sie nur wenige Tage (POHL-APEL 1980).

### **2.2.4.3 Die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse**

Über das Hypophysenportadersystem induziert GnRH in den Zielzellen der Adenohypophyse die Sekretion der Gonadotropine Luteinisierendes Hormon (LH) und Follikelstimulierendes Hormon (FSH) (HATTORI et al. 1986). Beim Vogel wurden bisher drei Isomere des Neurohormons aus dem Hypothalamus isoliert (BENTLEY et al. 2003, MIYAMOTO et al. 1984).

Die zyklische Ausschüttung von LH bewirkt in den Leydig-Zellen des Hodens die Androgenbiosynthese (SCANES 2000). Die Androgene Testosteron und Androstendion sind

für sekundäre Geschlechtsmerkmale wie Balz- und Dominanzverhalten, Gefiederfarbe und Gesang verantwortlich (ARDIA et al. 2010, BALTHAZART et al. 1992, FEDER et al. 1977). Zudem beeinflussen sie die Entwicklung und Reifung der Samenkanälchen und des Samenleiters (KIRBY und FROMAN 2000, POLLOCK und OROSZ 2002). Androgene spielen eine wichtige Rolle im Reproduktionstrakt männlicher Vögel. Zahlreiche Studien an unterschiedlichsten Vogelordnungen beschäftigen sich mit saisonalen Veränderungen des Plasma-Testosteronspiegels (FRAISSINET et al. 1987, KRISHNAPRASADAN et al. 1988, SMITH et al. 1997, WILLIAMS 1992). Bei vielen Vogelarten schwankt der Testosteronspiegel in Abhängigkeit von der spermatogenen Aktivität des Hodens (FOLLETT 1978).

FSH stimuliert das Hodenwachstum und die Spermatogenese (O'MALLEY 2005) durch Beeinflussung einer Vielzahl biosynthetischer Prozesse in den Sertoli-Zellen, die infolgedessen hypertrophieren. Das Gonadotropin besitzt die Möglichkeit der Selbstpotenzierung über eine Erhöhung der Rezeptoranzahl an den Zielzellen. Zudem existieren synergistische Effekte mit Testosteron, die diesen Mechanismus noch verstärken. Dies kann eine Erklärung für die extreme Gewichtszunahme der Hoden während der Brutsaison sein (TSUTSUI und ISHII 1978). Der Prozess der Spermatogenese ist also abhängig von der Verfügbarkeit an Testosteron und FSH, der Aktivität der Sertoli-Zellen sowie der Interaktion zwischen Sertoli- und Keimzellen (SHARPE 1994).

An der Steuerung der Reproduktion männlicher Vögel sollen weitere Steroidhormone beteiligt sein. Bei Papageien ist hierzu allerdings noch wenig bekannt. Östrogen beispielsweise beeinflusst die Hodenentwicklung bei Hühner- (FURUYA et al. 2006) und Sperlingsvögeln (ROCHESTER et al. 2010). Progesteron hingegen stimuliert das Nestpflege- sowie Aufzuchtverhalten von Greifvögeln (BLAS et al. 2010) und Tauben (LEA et al. 2001). Zudem ist es an der Ausbildung langfristiger Paarbindungen beteiligt, während Testosteron hierbei eine untergeordnete Rolle spielt (BLAS et al. 2010).

### **2.3. Techniken zur Einordnung des Reproduktionsstatus beim männlichen Papageienvogel**

Für die Charakterisierung der Hodenaktivität beim Papageienvogel existieren diverse Methoden. Davon basieren einige auf rein morphologischen Aspekten, während andere eher funktionelle Grundlagen besitzen. Im Folgenden soll auf die verschiedenen Techniken näher eingegangen werden.

#### **2.3.1 Makroskopische Beurteilung der Hoden mittels Endoskopie**

Der einzigartige Aufbau des aviären Respirationstraktes, der für eine ausgiebige Belüftung der Zölomhöhle sorgt, bietet geeignete Voraussetzungen für die Endoskopie von Vögeln (TAYLOR 1994). Wird die Leibeshöhle mit einem Endoskop exploriert, kollabieren die Lungen nicht (O'MALLEY 2005).

Bei *Psittaciformes* wird die minimal-invasive Laparoskopie seit Jahrzehnten zur Geschlechtsbestimmung und Beurteilung der Zuchttauglichkeit genutzt. Die routinemäßige Sexoskopie erfolgt unter Nutzung starrer Endoskope von 1,9 bis 2,7 mm Durchmesser (HARCOURT-BROWN 2005). Die Optik wird meist kranial des linken Femurs eingeführt (LIERZ 2006). Der Zugang von links begründet sich in der Tatsache, dass bei weiblichen Tieren lediglich das linke Ovar ausgebildet ist (HARCOURT-BROWN 2005).

Beim männlichen Papageienvogel erfolgt die makroskopische Beurteilung der Hodenaktivität anhand der Größe, Farbe und Gefäßzeichnung der Gonaden. Da die absolute Hodengröße endoskopisch schwer feststellbar ist, wird meist die relative Hodenausdehnung zu benachbarten Organen ermittelt. Hier kann die Nierenlängsachse (BEHNKE 2002) oder die Nebennierenlänge (CLUBB 2006) als Referenz herangezogen werden. Bei aktiven Hoden ragt die kaudale Hodengrenze weiter in die mittlere Nierendivision hinein (BEHNCKE 2002) beziehungsweise kann die Hodenlänge bis zu ein 4-faches der Nebennierenlänge betragen (HÄNSE 2012). Die Hodenfarbe wechselt von hellbraun bis gelb im inaktiven (O'MALLEY 2005) zu gelblich-weiß im aktiven Stadium (KÖNIG et al. 2009).

Die Sexoskopie ermöglicht eine umgehende Aussage zum Geschlecht und gleichzeitig können Veränderungen an anderen Organsystemen (z. B. Luftsackmykosen) diagnostiziert werden (HATT 2007). Aktive und inaktive Stadien sind makroskopisch gut voneinander abgrenzbar. Histologische Untersuchungen bei makroskopisch inaktiv beurteilten Hoden ergaben jedoch oftmals fortgeschrittenere Stadien der Spermatogenese (HÄNSE et al. 2008).

Die Sexoskopie kann erst ab einem bestimmten Alter bzw. mit dem Eintritt der Geschlechtsreife durchgeführt werden, da sich die Gonaden juveniler Männchen und Weibchen manchmal sehr ähneln. Die Methode erfordert eine Narkose und birgt somit gewisse Risiken für das untersuchte Tier (HATT 2007). Zudem können intraoperative Komplikationen, wie Blutungen (GARTRELL 2002) und Verletzungen an Niere oder Drüsenmagen durch das Endoskop (LIERZ 2006) auftreten. Zuletzt bedeutet der Zugang von links, dass eine Beurteilung der rechten Seite nicht möglich ist. Dies ist jedoch wichtig, um im Falle einer Infertilität Abnormalitäten wie beispielsweise Ovotestes oder Hermaphroditismus zu diagnostizieren (TAYLOR 1994).

### 2.3.2 Histologische und zytologische Beurteilung von Hodenbiopsaten

Zur Feststellung des Reproduktionsstatus ist die makroskopische Beurteilung des Hodens allein oft unzureichend (GARTRELL 2002). Zur histologischen Untersuchung von Hodenmaterial wurden Papageien früher häufig euthanasiert (MAITRA und DEY 1992, SAMOUR et al. 1987, SMITH und BRERETON 1976) oder unilateral kastriert (HUMPHREYS 1975). Die Methode der Hodenbiopsie im Rahmen einer endoskopischen Untersuchung stellt eine neue Möglichkeit zur Diagnostik von Fertilitätsstörungen (CLUBB 2006, TAYLOR 1994) sowie zur Beurteilung des Reproduktionsstatus bei *Psittaciformes* (GARTRELL 2002, HÄNSE et al. 2008, PEIXOTO et al. 2012) dar. Hierbei wird entweder mit einer feinen Biopsiezange (HÄNSE et al. 2008) Hodengewebe für eine histologische, oder mittels Feinnadelaspiration Zellmaterial für eine zytologische Untersuchung (GARTRELL 2002) gewonnen. Wichtiger Aspekt bei der Probenentnahme ist es, ein ausreichend großes und somit histologisch auswertbares Gewebestück zu gewinnen, gleichzeitig jedoch möglichst minimale Läsionen zu setzen (HÄNSE 2012).

Verglichen mit der histologischen Beurteilung von Hodenbiopsaten, ist die zytologische Untersuchung weniger invasiv (HÄNSE et al. 2008) und daher vor allem bei kleinen Vögeln empfehlenswert (GARTRELL 2002). Man benötigt geringere Materialmengen und die Probenaufarbeitung erfordert nur einige Minuten. Die Zytologie liefert vergleichbare Informationen über die saisonalen Variationen in der Spermatogenese mit hoher Übereinstimmung zur Histologie (HÄNSE 2012). Dennoch ermöglicht die Histologie zusätzliche Aussagen zur Zellarchitektur (GARTRELL 2002). Dies ist beispielsweise wichtig bei der Diagnostik von Hodentumoren oder Orchitis (TAYLOR 1994).

Beim Säugetier wird als Folge der Beschädigung der Blut-Hoden-Schranke, beispielsweise durch eine Biopsie, die Entstehung von gegen Keimzellen gerichteten Antikörpern (sogenannten „Antisperm-Antibodies“ oder ASA) diskutiert. Hier existiert möglicherweise ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der ASA und einer verminderten Spermaqualität

(ZHANG et al. 1990). Die an Papageienvögeln durchgeführten Hodenbiopsien bzw. Feinnadelaspirationen führten zwar vereinzelt zu makroskopisch sichtbaren Vernarbungen, ergaben jedoch langfristig keine negativen Auswirkungen auf die spermatologischen Parameter (GARTRELL 2002, HÄNSE 2012).

### **2.3.3 Endokrine Analyse von Blut und Kot**

Der endokrine Einfluss auf Reproduktionszyklen wurde bisher bei männlichen Tauben mittels Gonadektomie und darauffolgender Hormonersatztherapie (ERICKSON 1970) oder anhand der Messung peripherer Steroidhormonspiegel (KORENBROT et al. 1974) untersucht, ohne jedoch die hormonproduzierenden Zellen zu kennen. Die Gonadektomie führte bei den Tieren zu vermindertem Balz- und Nestrevierverhalten. Die Behandlung mit Testosteronpropionat konnte diese Verhaltensweisen wiederherstellen. Radioimmunoassays zur Messung des Östradiol- und Progesteronspiegels im Plasma ergaben während des gesamten Fortpflanzungszyklus männlicher Tauben niedrige bis nicht detektierbare Werte (KORENBROT et al. 1974). Studien an Wildvögeln zeigen einen Zusammenhang zwischen Schwankungen im Plasma-Testosteronspiegel und dem Reproduktionszyklus (GOYMANN et al. 2006). Die Androgenproduktion korreliert positiv mit der Hodengröße (GARAMSZEGLI et al. 2005) sowie der Ausreifung von Samenkanälchen und Samenleiter (POLLOCK und OROSZ 2002). Der Anstieg der Testosteronkonzentration im Blut weist also unmittelbar auf eine stattfindende Androgenbiosynthese und aktive Gonaden hin, und kann somit den Eintritt des männlichen Vogels in die reproduktionsaktive Phase anzeigen (NINNES et al. 2010). Des Weiteren gibt es bei wildlebenden Vögeln experimentelle Ansätze, die sich mit der Messung von Steroidhormonen im Kot beschäftigen (GOYMANN et al. 2002). Gerade im Hinblick auf gefährdete Arten ist der Vorteil dieser nicht-invasiven Methode offensichtlich. Während der gesamten Darmpassagezeit, die beim Vogel speziesspezifisch in Abhängigkeit von Ernährungstyp und Verdauungsphysiologie variiert (KLASING 2005), werden Hormonmetaboliten in die Fäzes ausgeschieden. Die Kotproben enthalten also eine Akkumulation von Hormonmetaboliten über diesen Zeitraum. Kurzfristige Veränderungen des Hormonspiegels, wie sie im Plasma zu ermitteln sind, können in diesem Medium nicht erfasst werden. Daher eignet sich die Hormonmessung im Kot vor allem für die Erarbeitung von Basisprofilen (NINNES et al. 2010).

Auf diesen Studien aufbauend wurde kürzlich auch für Papageienvögel die Testosteronanalyse in Plasma und Kot erfolgreich etabliert (HAHN et al. 2011). In Verbindung mit der Messung von Corticosteron im Kot waren Aussagen zum Reproduktionsstatus von Wellen-, Nymphen- und Halsbandsittichen möglich. Untersuchungen des Hormonverlaufes könnten künftig bei der Zuchtplanung berücksichtigt werden.

### 2.3.4 Immunzytochemische Beurteilung von Hodengewebe

Immunzytochemie ist eine Methode zur Sichtbarmachung spezifischer Antigene in Zellen und Geweben mit Hilfe markierter Antikörper. Es handelt sich um ein semiquantitatives Assay-System. Gewebe- und zellspezifische Proteinexpression, das Vorhandensein spezie-spezifischer Antigene und die embryonale Herkunft von Zellen sind wichtige Anwendungsgebiete für diese Technik (OKULICZ 1998).

Im Reproduktionstrakt von Säugetieren gilt die Immunzytochemie als etabliertes Verfahren zur Untersuchung physiologischer Prozesse (QIAN et al. 2013, TOSTES et al. 2013), aber auch zur Feststellung verschiedener pathologischer Zustände (HORNE und ADENIRAN 2011, TOSTES et al. 2013).

Beim Ziervogel hingegen kommt die Technik der Immunzytochemie routinemäßig bisher nur bei der Diagnostik von Tumoren (LANGOHR et al. 2012) sowie von Infektionen (TUNCA et al. 2012, VAN DEN BRAND et al. 2007) zur Anwendung. Die immunzytochemische Beurteilung des Reproduktionstraktes ist beim Ziervogel kaum etabliert. Der Grund hierfür ist vor allem, dass die Hoden im Vergleich zum Säugetier intrazölomal liegen und derartige Untersuchungen eine Eröffnung der Leibeshöhle erfordern. Auf dem Gebiet der Nutzgeflügel-forschung wiederum sind bereits zahlreiche immunzytochemische Untersuchungen am Geschlechtsapparat durchgeführt worden. In diesem Sektor wird die Technik stark vorangetrieben, da wirtschaftliche Interessen für das Erreichen maximaler Zuchterfolge im Vordergrund stehen. Je nach Fragestellung finden dabei unterschiedliche Marker Verwendung. Für die endokrinologische Diagnostik beispielsweise kommen Antikörper zum Einsatz, die gegen Steroidrezeptoren (DORNAS et al. 2008, OLIVEIRA et al. 2011) oder steroidogene Enzyme (KWON et al. 1995, MADEKUROZWA et al. 2002) gerichtet sind.

Hinsichtlich der saisonalen Veränderungen von Hoden- und Nebenhodengewebe wurden bisher nur histologische Untersuchungen beim Nutzgeflügel (AIRE 2002a, AIRE 2002b), bei Sperlingsvögeln (BAUCHINGER et al. 2007) und bei Papageienvögeln (GARTRELL 2002, HUMPHREYS 1975, SAMOUR et al. 1987) durchgeführt. Im Gegensatz zur reinen Histologie liefert die immunzytochemische Beurteilung auch Aussagen über funktionelle Abläufe. Eine Kombination von morphologischer Beurteilung der Gonaden und deren immunzytochemischer Analyse hinsichtlich der endokrinen Steuerung ist daher von entscheidendem Interesse.

Die mittels Immunzytochemie etablierten Marker können auch für andere quantitative und semiquantitative Analysesysteme, wie Radio- und Enzymimmunoassay oder Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) genutzt werden. Diese Systeme dienen der Untersuchung von z. B. Blut- oder Kotproben, die mit geringer Stressbelastung der Vögel gewonnen werden können (HAHN 2010).

## 2.4. Ausgewählte Marker für die immunzytochemische Untersuchung des Hodens

### 2.4.1 Steroidhormonrezeptoren

Die Wirkung der Steroidhormone erfolgt durch Bindung an intrazellulär exprimierte Rezeptoren der Zielzellen (EVANS 1988). Seit den 1980er Jahren ist bekannt, dass die Rezeptoren nukleär lokalisiert sind und über Transkriptionsprozesse eine genomische Wirkung entfalten (DUVAL et al. 1983). Neuere Untersuchungen zeigen aber, dass bei den Steroidrezeptoren auch nicht-genomische Mechanismen der Signaltransduktion existieren (BOONYARATANAKORNKIT und EDWARDS 2007, SIMONCINI et al. 2004).

#### 2.4.1.1 Androgenrezeptor (AR)

Im aviären Hoden- und Nebenhodengewebe war der immunzytochemische Nachweis des AR bisher nur bei Hühnern und Enten erfolgreich (DORNAS et al. 2008, SHANBHAG und SHARP 1996). Beim Säugetier hingegen erfolgte die Lokalisation des AR in zahlreichen Zelltypen des Hodens (KONRAD et al. 1998, VORNBERGER et al. 1994). Die Expression des Rezeptors im Gehirn verschiedener Vogelspezies hat gezeigt, dass bestimmte Verhaltensweisen, wie beispielsweise Dominanz oder Gesang Testosteron-vermittelt sind (BALHAZART et al. 1992, BELLE und LEA 2001).

#### 2.4.1.2 Östrogenrezeptoren (ER $\alpha$ , ER $\beta$ )

Die zwei Subtypen des Östrogenrezeptors, ER $\alpha$  und ER $\beta$ , teilen sich die gleiche Grundstruktur. Sie unterscheiden sich hinsichtlich der Affinität ihrer Liganden. So bindet Östradiol an beide Isoformen, Östron hingegen vorzugsweise an ER $\alpha$  und Östriol an ER $\beta$  (DAHLMAN-WRIGHT et al. 2006).

OLIVEIRA et al. (2011) konnten die Expression von ER $\beta$  bereits in männlichen Gonaden von Hühnerküken zeigen. Bei Säugetieren moduliert dieser Rezeptor-Subtyp die Wirkungen von ER $\alpha$  im weiblichen Geschlechtstrakt (WEIHUA et al. 2000).

Dass Östrogene das Sexualverhalten von Vögeln beiderlei Geschlechts kontrollieren, wurde anhand der Detektion von ER $\alpha$  im Gehirn von *Passeriformes* (GAHR 1990) und *Galliformes* (HALLDIN et al. 2006) nachgewiesen. Im aviären weiblichen Geschlechtstrakt gelang die immunzytochemische Darstellung von ER $\alpha$  bisher nur beim Nutzgeflügel (GONZALEZ-MORAN et al. 2013, ISOLA 1990). Bei Hähnen wurde der Rezeptor lediglich im Nebenhodengewebe untersucht (KWON et al. 1997, OLIVEIRA et al. 2011). Bei Säugetieren hingegen erfolgte der Nachweis von ER $\alpha$  in den Leydig-Zellen, was auf eine Beteiligung des Östrogens bei der Leydig-Zell-Reifung hindeutet (ZHAI et al. 1996).

Zusätzlich existieren Untersuchungen zur Expression des Rezeptors in Sertoli- und Keimzellen von Mammalia (PEARL et al. 2011, PELLETIER et al. 2000).

### **2.4.1.3 Progesteronrezeptor (PR)**

Die bisherigen Untersuchungen zu Progesteron beim Vogel konzentrierten sich auf dessen Funktion im weiblichen Geschlechtsapparat (MADEKUROZWA 2002a, MADEKUROZWA 2002b) sowie auf Nestpflege- und Aufzuchtverhalten (BLAS et al. 2010, LEA et al. 2001). Deshalb erfolgte der Nachweis des PR im Gehirn von Tauben (LEA et al. 2001) und in weiblichen Geschlechtsorganen von Nutzgeflügel (GONZALEZ-MORAN et al. 2013, MADEKUROZWA 2002a). Die immunzytochemische Darstellung PR-positiver Zellen im Hodengewebe gelang bislang lediglich beim Säugetier (KÖHLER et al. 2007). Dort konnte eine PR-Expression in Spermato gonien, Sertoli- und Leydig-Zellen gezeigt werden (KONRAD et al. 1998, WEBER et al. 2002). Hierbei soll Progesteron sowohl einen Einfluss auf die Spermatogenese als auch auf die Steroidbiosynthese haben (EL-HEFNAWY und HUHTANIEMI 1998, ROSSATO et al. 1999).

### **2.4.2 Steroidogene Enzyme**

Die Steroidbiosynthese geht von Cholesterol aus und ist ein Prozess zahlreicher katalytischer Reaktionen in den ortständigen Enzymsystemen von Mitochondrien und endoplasmatischem Retikulum (BAMBERG 1994). Steroidogene Enzyme lassen sich in zwei Hauptklassen von Proteinen einordnen: die Cytochrom-P450-Oxidasen und die Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSDs) (HANUKOGLU 1992). Die P450-Enzyme katalysieren die Hydroxylierung und Spaltung des Steroidsubstrates (PAYNE und HALES 2004), während die HSDs oxido-reduktive Vorgänge unter Mitwirkung von NAD<sup>+</sup> oder NADP<sup>+</sup> steuern (MILLER 2008). Im Folgenden werden die in der vorliegenden Studie untersuchten Enzyme näher beschrieben.

#### **2.4.2.1 Aromatase (ARO)**

Die Umwandlung von Androstendion zu Östron sowie von Testosteron zu Östradiol wird durch dieses Cytochrom-P450-Enzym katalysiert. Untersuchungen beim Vogel konzentrierten sich hauptsächlich auf die Enzymaktivität im Gehirn diverser Spezies (ROS et al. 2009, VOIGT et al. 2011, WACKER et al. 2010). Der bislang einzige immunzytochemische Nachweis der ARO in den Gonaden des Hahns (KWON et al. 1995) erfordert einen Vergleich mit der Lokalisation des Enzyms bei anderen Vogelspezies. Beim Säuger ist die ARO in erster Linie ein Marker für Leydig-Zellen, wurde aber in Abhängigkeit von Spezies und Reproduktionszustand auch in Keim-, Sertoli- und epididymalen Zellen nachgewiesen (CARREAU et al. 2003).

#### 2.4.2.2 $3\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase ( $3\beta$ -HSD)

$3\beta$ -HSD katalysiert zahlreiche Reaktionen auf dem Biosyntheseweg des Testosterons aus Pregnenolon. Das Enzym steuert die Umwandlung von Pregnenolon zu Progesteron, außerdem von Dehydroepiandrostenon zu Androstendion sowie von  $\Delta^5$ -Androstendiol zu Testosteron (SOMA et al. 2004, UKENA et al. 2001). Auf Genebene wurden bei Hühner- und Sperlingsvögeln zahlreiche Nachweise von  $3\beta$ -HSD im Gehirn, Ovarien und Hoden erbracht (FREKING et al. 2000, KANDA et al. 2000, UKENA et al. 1999). Die Peptidexpression erfolgte mittels histochemischer und immunzytochemischer Methoden bislang nur im männlichen (MADEKUROZWA et al. 2002) und weiblichen (PROSZKOWIEC-WEGLARZ et al. 2005) Reproduktionstrakt von Nutzgeflügel.

#### 2.4.2.3 $17\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen 1, 2 und 7 ( $17\beta$ -HSD-1, -2 und -7)

$17\beta$ -HSDs sind oxido-reduktive, steroidogene Enzyme, die unter anderem die Umwandlung von Androstendion in Testosteron und von Östron in Östradiol katalysieren. Die Isoenzyme unterscheiden sich hinsichtlich der Verteilung im Gewebe, katalytischer Präferenz, Substratspezifität und Regulationsmechanismen (ROMERO et al. 2009). Im Reproduktionstrakt zahlreicher Säugetierspezies wurden bereits diverse  $17\beta$ -HSDs isoliert (LEMAZURIER und SÉRALINI 2002, PENNING 1997). Beim Vogel existieren bisher nur Publikationen über die Expression der Isoenzyme im Gehirn von Wachteln (MATSUNAGA et al. 2002) und Finken (RITERS et al. 2001) sowie im Ovar von Hühnern (WAJIMA et al. 1999). Die Funktion der  $17\beta$ -HSDs im aviären männlichen Geschlechtstrakt ist bisher nicht untersucht worden.

#### 2.4.3 Relaxinpeptid-Familie

Aus der Relaxinpeptid-Familie sind bisher sieben Peptide bekannt, die alle eine strukturelle Verwandtschaft mit Insulin aufweisen: Relaxin (RLN; früher H2-RLN), H1-Relaxin und Relaxin 3 (RLN3) sowie vier verschiedene Insulin-like Peptide (INSL3-6). Obwohl strukturell verwandt entfalten sie ihre sehr unterschiedlichen physiologischen Effekte über die Aktivierung vier verschiedener Rezeptoren (RXFP1-4). So ist beispielsweise RLN3 als reines Neuropeptid in Stress- und Stoffwechselsteuerung involviert, während INSL5 vornehmlich im Gastrointestinaltrakt wirkt (BATHGATE et al. 2013, IVELL et al. 2011). Im Folgenden soll jedoch nur auf die in der Studie verwendeten Marker RLN, INSL3 (RLF) sowie deren Rezeptoren RXFP1 und -2 genauer eingegangen werden.

#### 2.4.3.1 Relaxin (RLN)

Das heterodimere Relaxin aus der Familie der Insulin-Superfamilie ist ein pleiotropes Peptidhormon, dessen Wirkungen ausgesprochen gewebs- und spezieabhängig sind (BANI 1997). Bei Säugetieren ist seine weitreichende Bedeutung im weiblichen Reproduktionstrakt, im kardiovaskulären und pulmonalen System, im Gehirn sowie in Tumoren bekannt (HOMBACH-KLONISCH 2004). Außerdem wurde RLN in verschiedenen Zelltypen des Säuger-Hodens (CARDOSO et al. 2010, KOHSAKA et al. 2009) und als Hauptprodukt des Prostataepithels (IVELL et al. 2011) nachgewiesen. Somit beeinflusst es die Spermatogenese, Steroidogenese (KOHSAKA et al. 2009), Spermienbeweglichkeit sowie die Befruchtung (AGOULNIK 2007). Abgesehen von wenigen Publikationen beim Wirtschaftsgeflügel über eine Relaxin-ähnliche Aktivität im Ovar (HISAW und ZARROW 1950) und Hoden (STEINETZ et al. 1964) bleibt die Rolle von RLN im Reproduktionstrakt des Vogels ungeklärt.

#### 2.4.3.2 Relaxin-like factor (RLF)

Der dem Relaxin strukturell verwandte Relaxin-like factor (RLF), auch INSL3 (Insulin-like peptide 3) genannt, gilt bei Säugetieren als Marker der Leydig-Zellen und ist für den Hodenabstieg mitverantwortlich (AGOULNIK 2007). Untersuchungen an Rattenhoden (KAWAMURA et al. 2004) deuten auf eine Beeinflussung der Meiose männlicher Keimzellen hin. Über die Existenz von RLF beim Vogel ist bislang nichts bekannt.

#### 2.4.3.3 Rezeptoren für Relaxin und Relaxin-like factor: RXFP1 und RXFP2

Spezielle Rezeptoren aus der LGR-Subfamilie (LGR, *Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors*) vermitteln die Wirkung von Relaxin und Relaxin-like factor (HSU et al. 2000, HSU et al. 2002, KUMAGAI et al. 2002). Früher unter der Bezeichnung LGR7 und LGR8 bekannt, werden sie heute als RXFP1 (*Relaxin Family Peptide Receptor 1*) und RXFP2 bezeichnet (SUMMERS et al. 2013). Es handelt sich um G-Protein-gekoppelte 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren. Relaxin gilt in erster Linie als Ligand für RXFP1 (HSU et al. 2002), kann aber auch mit einer geringeren Affinität an RXFP2 binden (SCOTT et al. 2005). Die Wirkung von Relaxin-like factor wird einzig über RXFP2 vermittelt (KUMAGAI et al. 2002).

Der bisher einzige Nachweis funktioneller Relaxinrezeptoren im aviären Organismus erfolgte im Kropf männlicher und weiblicher Tauben (SHERWOOD 1994). Bei Säugetieren hingegen vermitteln RXFP1 und -2 die Wirkung ihrer Liganden unter anderem in den Leydig-Zellen (AGOULNIK 2007, IVELL und ANAND-IVELL 2009) und im Keimepithel des Hodens (KOHSAKA et al. 2009).

### **2.4.4 Proliferationsmarker**

Die zyklusbedingten Veränderungen in der Morphologie von Hoden und Nebenhoden sind das Resultat von Proliferation und Apoptose. Für beide Vorgänge gibt es entsprechende immunzytochemische Marker, die sowohl in der Human- als auch Tiermedizin zum Einsatz kommen (BREHM et al. 2006, GLANDER und SCHALLER 1999, WAGNER et al. 2006, YOUNG und NELSON 2001). Die Proliferationsmarker dienen vor allem in der Tumordiagnostik der Unterscheidung hyperplastischer und neoplastischer Veränderungen. Mit ihrer Hilfe kann das Proliferationsverhalten von Geweben charakterisiert werden.

#### **2.4.4.1 Ki67**

Im Gewebe findet sich das Ki67-Antigen in proliferierenden Zellen. In nahezu allen Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2- und M-Phase) wird dieses Antigen exprimiert. Ruhende Zellen, also Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, exprimieren das Ki67-Antigen nicht (GATTER et al. 1986).

Im aviären Hoden steht der immunzytochemische Nachweis des Ki67 noch aus. Beim Wirtschaftsgeflügel existiert bisher eine Publikation, die die Proliferationsrate von Sertoli-Zellen anhand einer BrdU(5-bromo-2-deoxyuridin)-Färbung untersucht hat (BOZKURT et al. 2007). Bei Säugern hingegen kommt zur Ermittlung der mitotischen Aktivität von Keimzellen (MCKINNELL et al. 2013) und Sertoli-Zellen (BREHM et al. 2006) der kernständige Proliferationsmarker Ki67 zum Einsatz.

#### **2.4.4.2 Aktin (Smooth Muscle Actin, SMA)**

Das Strukturprotein Aktin kommt in allen eukaryotischen Zellen vor und gehört zu den fünf häufigsten Proteinen, die bei Säugetieren und Vögeln nachgewiesen wurden. Es bildet intrazellulär die sogenannten Aktinfilamente, die wichtige Bestandteile des Zytoskeletts darstellen und oftmals in Transportprozesse involviert sind (ALBERTS et al. 1989, HOLMES et al. 1990). Im aviären männlichen Geschlechtstrakt sind kontraktile Zytoskelettproteine notwendig für den Transport der Samenflüssigkeit durch die Hodenkanälchen (AIRE und OZEGBE 2008). Da vor allem das Mikrofilament SMA bereits im Hodengewebe von Hühner-, Enten- und Sperlingsvögeln nachgewiesen wurde (AIRE und OZEGBE 2007, MARETTA und MARETTOVÁ 2004, OZEGBE et al. 2012), stellt sich die Frage, welche Rolle es dort in der Ordnung der Papageienvögel spielt.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Publikation 1

Susanne Reitemeier, Maria Hänse, Anke Hahn, Volker Schmidt,  
Katrin Steinbach-Sobiraj, Maria-Elisabeth Krautwald-Junghanns,  
Almuth Einspanier

**Evaluating the reproductive status of the male budgerigar  
(*Melopsittacus undulatus*)**

Gen Comp Endocrinol. 2011. doi: 10.1016/j.ygcen.2011.02.028



Contents lists available at ScienceDirect

General and Comparative Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ygcen



Evaluating the reproductive status of the male budgerigar (*Melopsittacus undulatus*)

Susanne Reitemeier<sup>a,\*</sup>, Maria Hänse<sup>a</sup>, Anke Hahn<sup>b</sup>, Volker Schmidt<sup>a</sup>, Katrin Steinbach-Sobiraj<sup>a</sup>, Maria-Elisabeth Krautwald-Junghanns<sup>a,1</sup>, Almuth Einspanier<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Clinic for Birds and Reptiles, Veterinary Faculty, University of Leipzig, An den Tierkliniken 17, 04103 Leipzig, Germany

<sup>b</sup> Institute of Physiological Chemistry, Veterinary Faculty, University of Leipzig, An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany

ARTICLE INFO

Article history:  
Received 30 October 2010  
Revised 5 February 2011  
Accepted 25 February 2011  
Available online 4 March 2011

Keywords:  
Psittaciformes  
Testes  
Immunocytochemistry  
Steroid receptors  
Hydroxysteroid dehydrogenase

ABSTRACT

Limited knowledge about male psittacine reproduction reduces the success of breeding programmes. Within the scope of fecundity assessment, classification of male sexual status is essential for effective conservation of the species.

The aim of the present study was to investigate the testes of male budgerigars (*Melopsittacus undulatus*), as psittaciform model species to verify their reproductive status by morphological and immunocytochemical examination.

Using light microscopy, gonadal samples were categorized resulting in three reproductive states (active, intermediate, non-active). Calculation of testes weights plus measurement of tubular and interstitial dimensions displayed significant ( $p \leq 0.05$ ) differences between all three reproductive stages. Lipids in the testicular tubules, analysed by Sudan black staining and fluorescence microscopy (DAPI<sup>2</sup> mode) were highly present in non-active status.

Immunocytochemistry involved two different hydroxysteroid dehydrogenases (HSD), 3 $\beta$ -HSD and 17 $\beta$ -HSD-2, as markers for steroidogenesis, as well as steroid receptors for androgens (AR), oestrogen (ER) and progesterone (PR).

Both HSDs and AR declined in non-active gonads compared to active and intermediate stages, with a positive signal in germ and somatic cells of testis and epididymis. ER and PR were detected in testicular and epididymal cells, similarly expressed in all three stages.

The proliferation rate of germ cells in the testicular tubules, obtained by Ki67, differed significantly in active (38.67%), intermediate (32.40%) and non-active (6.01%) status.

According to this morphological study, we have been able to establish markers for the reproductive staging of psittacine testes. This knowledge will be useful to deepen reproductive biology in budgerigars.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The threat of feral *Psittaciformes* is constantly increasing [9,28] and this dramatic decline of many parrot species requires not just protective action but also more precise information about psittacine reproduction. Knowledge about parrot procreation is still scarce and, in combination with constricted genetic diversity, breeding efforts in captivity are quite difficult. The classification

of their reproductive status will help to support the success of breeding programs.

The male genital system of birds, mainly well-studied in poultry [33,38], is morphologically comparable with the mammal situation; nevertheless, there are difficulties concerning transferability between these two animal classes. Concerning the seasonal testicular and epididymal development associated with reproduction, morphological descriptive investigations have been published so far in poultry [1,2,32], passerine [7] and psittacine birds [24,27,61]. As yet, there has been no combination of the morphological analysis with an immunohistochemical examination of the endocrine situation.

In birds, the major androgens testosterone and androstenedione stimulate the secondary sex characteristics including courtship, coloration, song, and the development and maturation of the tubules, particularly the ductus deferens [33,54]. Testosterone especially influences male-male dominance in zebra finches [3] and its peripheral plasma level is associated with mate choice in ring doves [20]. Even though birds show a coherency between

\* Corresponding authors. Fax: +49 341 97 38 409 (S. Reitemeier); +49 341 9738 119 (A. Einspanier).

E-mail addresses: reitemeier@vogelklinik.uni-leipzig.de (S. Reitemeier), haense@vogelklinik.uni-leipzig.de (M. Hänse), hahn@vetmed.uni-leipzig.de (A. Hahn), volker.schmidt@vogelklinik.uni-leipzig.de (V. Schmidt), sobiraj@vogelklinik.uni-leipzig.de (K. Steinbach-Sobiraj), krautwald@vogelklinik.uni-leipzig.de (M.-E. Krautwald-Junghanns), einspanier@vetmed.uni-leipzig.de (A. Einspanier).

<sup>1</sup> Equal contributors.

<sup>2</sup> Abbreviations used: DAPI, 4',6-diamidin-2-phenylindol; HSD, hydroxysteroid dehydrogenase; AR, androgen receptor; R, oestrogen receptor; PR, progesterone receptor; IUCN, international union for conservation of nature.

testosterone levels and sexual behaviour [18], endocrine correlates of reproductive cycles have only been studied by means of gonadectomy [17] or the analysis of peripheral testosterone levels [68] without knowing the hormone-producing cells. The AR as a binding site for testosterone was detected in the brain of the Japanese quail, the canary, the zebra finch [6] and the ring dove [8]. The confirmation of AR in the avian testis and epididymis by means of immunocytochemistry has only been successful in roosters and drakes [14,67].

Other steroid hormones are involved in male bird reproduction; however, less is known about the situation in *Psittaciformes*. Oestrogen influences the testicular development in chickens [22] and zebra finches [57], while progesterone is important for parental behaviour in black kites [11] and ring doves [8]. So far, using immunocytochemistry, steroid receptors for oestrogen and progesterone have been detected in the avian female reproductive tract [43] and brain [4]. The distribution of ER and PR in testicular tissue has only been examined in mammals [34,35].

The gene expression of the steroidogenic enzymes 3 $\beta$ -HSD and 17 $\beta$ -HSD-2 has been demonstrated in the quail brain [72,73] as well as in the gonads of chickens and zebra finches [21,31]. The peptide detection of these enzymes in the reproductive tract via immunocytochemical analysis has only been carried out in female [49] and male [44,70] poultry.

For the benefit of endangered *Psittaciformes*, we used the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*, IUCN<sup>3</sup> Red List status: least concern, [28]) as a model species. The present study aimed to resolve issues concerning the presence of steroid hormone receptors and steroidogenic enzymes in the psittacine male reproductive tract. Our principal object was to deliver basic information, especially about the steroid target cells within the testis and epididymis, in conjunction with gonadal histology in order to ascertain the reproductive status of male parrots.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experimental procedure

Within the scope of routine necropsies at the Clinic for Birds and Reptiles, 45 male budgerigars (4 years of age on average, 35–50 g of weight) were examined. Only those birds were included which had no pathological findings on their testes. The material collection was carried out from October 2005 to September 2007.

The assessment of the reproductive status took place firstly by means of macroscopical and secondly histological examination in order to compare both methods. The gonads were located at the cranial pole of the kidneys and their reproductive activity was appraised macroscopically. The testes were measured in situ (length  $\times$  width in mm) and then carefully dissected out of the abdominal cavity for the subsequent histological investigation.

### 2.2. Histochemical staining

The paraffin-embedded testes were cut into 5  $\mu$ m sections and then mounted on slides. For general morphology, tissue sections were stained with Mayer's haematoxylin and 0.5% of eosin (HE). Within the scope of the following light microscopy of the HE-stained samples, lipid material was detected in the testicular tubules. To confirm this tubular lipid content, a Sudan black staining of the sections was subsequently carried out. Sudan black B (Sigma, Aldrich Chemie, Deisenhofen, FRG) colours phospholipids, neutral fats and sterols dark blue to black [58]. To specify the lipids, fluorescence microscopy using DAPI mode was additionally conducted with the Axioskop 2 mot plus (Carl Zeiss, Jena, FRG). For this purpose, the de-waxed testis material was stained with Mayer's haematoxylin and then covered with Gel Mount™ Aqueous Mounting Medium (Sigma, Aldrich Chemie, Deisenhofen, FRG).

matoxylin and then covered with Gel Mount™ Aqueous Mounting Medium (Sigma, Aldrich Chemie, Deisenhofen, FRG).

### 2.3. Characterization of the reproductive status

For the histological analysis of the HE-stained tissue sections a standardized investigation protocol (based on Gartrell and Humphreys [24,27]) was used. The reproductive status was characterized by means of different parameters using the Axioskop 2 mot plus with 400 $\times$  magnification and the pictorial documentation system AxioVision (AxioVs 40 V 4.5.0.0, Carl Zeiss Imaging Solutions, Jena, FRG). The interstitial cell layers and the appearance of the germinative epithelium were assessed, as well as the spermatozoa morphology and their approximated quantity (by means of a graduated scale from 1–25%, 26–50%, 51–75% and 76–100%). The epididymides were additionally investigated concerning the existence and amount of spermatozoa. A supplemental measurement of tubular and interstitial dimensions followed, scaling 10 fields of view per slide with 200 $\times$  magnification. The testes weights in mg were calculated using the detected dimensions in situ (length  $\times$  width in mm) and a modified formula [53].

Testis mass (mg) =  $1.087 \text{ (mg mm}^{-3}) \frac{4}{3} \pi a^2 \text{ (mm)} b \text{ (mm)}$  ( $a$ : semi-width and  $b$ : semi-length of each testis). The formula was based on the ellipsoid form of the testis and the calculation of mass via volume and density. The density value of  $1.087 \text{ mg mm}^{-3}$  was adopted from Pitcher et al. [53], while the volume of an ellipsoid was determined by means of the semiaxes  $a$  and  $b$ . The calculated testis mass of the right and left testis was summed up.

The interpretation of the Sudan black staining and the lipofuscin fluorescence was carried out by estimating both the lipid and the lipofuscin content within the tubules (by means of a graduated scale from 0%, 1–50% and >50%).

The gonadal samples were assigned to three different reproductive types. The quantity of spermatids and spermatozoa plus the tubular and interstitial dimensions were the main criteria for the definition of a non-active (stage 0), intermediate (stage 1) and active status (stage 2).

### 2.4. Immunocytochemistry

The immunocytochemical examination of nuclear AR, ER and PR started with a pre-treatment of the de-waxed tissue sections in citrate buffer (pH 6.0) at 120 °C for 30 min using a steamer [15]. Subsequently, the samples were cooled down and brought to 0.0125% trypsin solution at 37 °C for 15 min. After washing in phosphate-buffered saline (PBS, Phosphate Balanced Salt Solution, Dulbecco, Biochrom, Berlin, FRG; pH 6.0), the testicular material was incubated in a solution of 3% hydrogen peroxide to inhibit endogenous peroxidase. Another washing procedure was followed by staining the sections with alcoholic Sudan black solution 2% for 20 min. This step was designed to prevent an unspecific reaction of the above-named tubular lipids with the primary antibody. After rinsing with ethanol 70%, the tissue samples were incubated with pigeon plasma (1:100 dilution of Aqua bidest.) to avoid non-specific binding of the primary antibody. The adjacent incubation with the antibody (AR: Dianova, Hamburg, FRG, polyclonal recombinant human AR, Rabbit IgG, in a 1:150 dilution of PBS; ER: Euromedex, Souffelweyersheim, France, monoclonal anti-human ER  $\alpha$ , Murine IgG, in a 1:50 dilution of PBS and PR: Immunotech, Marseille, France, polyclonal recombinant human PR, Mouse IgG, in a 1:50 dilution of PBS) took place for 2 h at room temperature. After washing in PBS, the sections were reacted with Dako EnVision® + Dual Link System Peroxidase (DakoCytomation, Carpinteria, USA) for 45 min. The enzyme activity was visualized using the chromogenic substrate AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol; AEC Substrate Kit for Peroxidase, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Finally, the

tissue sections were covered with Immu-Mount® (Thermo-Scientific, Pittsburgh, USA).

To detect the cytoplasmic located enzymes, such as steroidal enzymes 3β-HSD and 17β-HSD-2, the de-waxed tissue sections were treated similarly to the steroid receptors, except the heating in a citrate buffer was omitted. The subsequent incubation with rabbit anti-peptide polyclonal antibody (Pineda, Berlin, FRG, 3β-HSD: rabbit anti-peptide H3BHSDP-5C-antibody, in a 1:4000 dilution of PBS; 17β-HSD-2: rabbit anti-peptide antibody, in a 1:1250 dilution of PBS) took place for 2 h at room temperature. The antigen-antibody reaction was visualized in the same manner as the steroid receptors. Additionally, the material was counterstained with Mayer's haematoxylin.

For the detection of Ki67-positive cell nuclei, a double-indirect method was applied (based on Scholzen et al. [64]) with a tertiary antibody. After deparaffinizing in Xylol and various concentrations of Acetone in sequence (100%, 70% and 40%), the sections were heated in citrate buffer (pH 6.0) at 120 °C for 25 min using a steamer. The cooling down in Aqua bidest was followed by incubation in 3% hydrogen peroxide solution in TBS buffer (Tris Balanced Salt Solution, Karl Roth, Karlsruhe, FRG; pH 7.5) to inhibit endogenous peroxidase. The tissue samples were rinsed with TBS and then incubated with pigeon plasma (1:100 dilution of Aqua bidest) for 10 min. The sections were washed in TBS after which bovine serum albumine (BSA, Sigma, Aldrich Chemie, Deisenhofen, FRG) 5% in Aqua bidest was applied for another 10 min. The polyclonal rabbit anti-mouse antibody (Dr. Thomas Scholzen, Forschungszentrum Borstel, FRG, in a 1:4000 dilution of TBS supplemented by 10% pigeon plasma 1:100) was incubated for 30 min. Intercepted by triple TBS washing steps, the testicular material was reacted with the peroxidase-conjugated secondary and tertiary antibody (Dianova, Hamburg, FRG, secondary antibody: polyclonal goat anti-rabbit; tertiary antibody: polyclonal rabbit anti-goat, both in a dilution of 1:50 in TBS supplemented by 10% pigeon plasma 1:100), respectively for 30 min. The visualization of peroxidase activity was carried out using the chromogenic substrate DAB (Sigma Fast™ 3,3'-Diaminobenzidin- und Urea-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Entwickler-tabletten, Sigma, Aldrich Chemie, Deisenhofen, FRG) and was followed by counterstaining with Mayer's Haematoxylin. Finally, the tissue sections were covered with Immu-Mount® (Thermo-Scientific, Pittsburgh, USA).

2.5. Statistical analysis

The interpretation of the immunocytochemistry was carried out using a light microscope (Axioskop 2 mot plus) with 100×, 200× and 400× magnification. The distribution of steroid receptors (AR, ER and PR) and the cytoplasmic enzymes 3β-HSD and 17β-HSD-2 in the testicular and epididymal tissues was recorded.

The percentage of testes and epididymides that reacted positively to steroid receptors and HSD markers was noted.

Also the AR-, ER-, PR- and Ki67-positive cells were included and additionally counted (counting 6 × 100 cells per slice in oil immersion, 630× magnification).

Investigated via Windows SPSS 11.5, all the results were presented in terms of mean values ± SEM (Standard Error of the Mean) and statistically compared using the Mann-Whitney Test. The level of significance was defined at *p* ≤ 0.05.

3. Results

3.1. Analysis of macroscopical situation, testes sizes and weights

The assessment of the reproductive status was conducted by macroscopy and microscopy. Macroscopic analysis was successful

in 78% of all analysed cases (35 out of 45 cases). The macroscopic confirmation was effective in the active forms for 95% (21 out of 22 analysed cases) and in the non-actives for 82% (11 out of 13 analysed cases), whereas the intermediate gonads only showed a 30% correct analysis (3 out of 10 cases). Therefore, only the active and non-active gonads allow a precise staging by macroscopy (e.g. laparoscopy for reproductive staging).

The active testes proved to be the largest (8.5 ± 1.3 mm length, 4.9 ± 0.8 mm width), followed by the intermediate ones (5.6 ± 1.3 mm length, 3.5 ± 0.9 mm width). The non-active gonads were the smallest (3.3 ± 0.7 mm length, 2.0 ± 0.9 mm width).

The testes weights differed significantly (*p* ≤ 0.05) in active, intermediate and non-active status (Table 1). In addition, the budgerigars showed a correlation between reproductive situation and the percentage of testes weight compared with the body mass (data not shown).

3.2. Tubular and interstitial dimensions

The tubular and interstitial dimensions varied significantly between the three reproductive states (Figs. 1 and 2). The non-active testes presented the smallest tubules (57.6 ± 10.8 μm) and the most expanded interstitial tissue (11.8 ± 4.1 μm), whereas the active ones displayed conversely (tubular dimensions 151.7 ± 30.2 μm; interstitial dimensions 3.8 ± 1.2 μm). The intermediate forms took an interim position (tubular dimensions 110.9 ± 28.2 μm; interstitial dimensions 6.8 ± 3.7 μm).

3.3. Morphological analysis

The non-active testes were characterized by a minimum of 3, mostly 4 or more cell layers in interstitial tissue, while nearly all

Table 1  
Criteria for the evaluation of the reproductive status in budgerigars.

	Non-active testis	Intermediate testis	Active testis
Spermatid quantity (%)	0–25	26–75	76–100
Spermatozoa quantity (%)	0	1–50	51–100
Interstitial dimensions (μm)	>8	5–8	2–5
Tubular dimensions (μm)	30–75	75–125	>125
Testes weights (mg)	18.0 ± 16.3	89.2 ± 63.3	244.3 ± 71.1

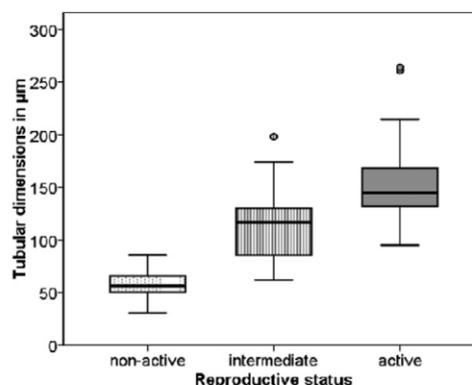


Fig. 1. Box plot diagram of the tubular dimensions in non-active (n = 10), intermediate (n = 10) and active (n = 10) gonads of budgerigars.

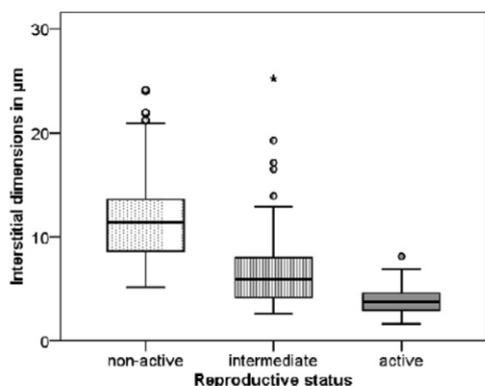


Fig. 2. Box plot diagram of the interstitial dimensions in non-active ( $n = 10$ ), intermediate ( $n = 10$ ) and active ( $n = 10$ ) gonads of budgerigars.

of them displayed maximum 4 in germinative epithelium containing spermatogonia, Sertoli (or sustentacular) cells and spermatocytes (Fig. 3a).

The intermediate gonads showed varieties in the number of interstitial cell layers (1–4) and tubular cell layers (4–10). Eighty percent had a germinative epithelium including all types of germ cells (Fig. 3b). The intertubular tissue of active testes constantly exhibited a maximum of 2 cell layers, while 90% of them demonstrated 7–12 tubular cell layers. The active forms always showed all types of germ cells with spermatozoa arranged in spike stadium (Fig. 3c). The localisation of sperm in intermediate tubules was mainly disordered. In active testes, slim and elongated sperm morphology dominated (77% of all active samples), whereas basically short, plump and convoluted spermatozoa were identified in intermediate ones (63% of all intermediate samples). The approximated quantity of spermatozoa generally did not exceed 25% in the intermediate gonads (80% of all intermediate samples). The active forms always displayed quantities over 50%, mainly 76–100% (64% of all active samples).

The sustentacular (Sertoli) and interstitial (Leydig) cells were found in all three reproductive states without noticeable morphological differences.

The efferent ducts and the epididymal duct of non-active and intermediate testes constantly did not contain spermatozoa. The active epididymides (efferent ducts and epididymal duct) were chiefly filled with spermatozoa (87% of all active samples), over 60% demonstrated a moderate to high-grade content.

The morphological analysis resulted in a summary of criteria for the evaluation of the reproductive status (Table 1).

### 3.4. Sudan black staining

Sudan black B detects phospholipids, neutral fats and sterols by colouring them dark blue to black [58]. Sudan black staining of all non-active and 60% of the intermediate testes displayed black lipid masses in the tubular centres (Fig. 3d and e), one third with a lipid content over 50%. Lipids are adelomorphous in the active form (Fig. 3f) and only 5% of this type showed a lipid content over 50%.

### 3.5. DAPI-fluorescence

The cellular pigment, lipofuscin, is a yellow–brown oxidised, crosslinked aggregate, consisting of oxidised proteins and lipid clusters [30], including at least ten fluorophores [65].

The yellow to yellow–red auto-fluorescence of lipofuscin was demonstrated in non-active and intermediate gonads (Fig. 3g and h, two-thirds of both reproductive states revealed a lipofuscin content over 50%). The role of lipofuscin in the active testis is evanescent (Fig. 3i). Under one-fifth of the samples incorporated more than 50% lipofuscin. Sporadically, blue auto-fluorescent particles were detected in non-active and intermediate stages.

Comparing Sudan black staining and DAPI-fluorescence, it was remarkable, that the lipofuscin content in all reproductive forms (in each status approximately 75% of the samples) was higher than the lipid content detected using Sudan black. In some cases, no lipids were demonstrated using Sudan black, while lipofuscin was verifiable (40% of the intermediate and 32% of the active samples). Conversely, evidence of more Sudan black-positive lipids than lipofuscin could only be provided in 8% of the non-active gonads.

### 3.6. Immunocytochemistry

The steroid receptors AR and ER were demonstrated in spermatocytes as well as in ciliated and non-ciliated cells of efferent ductal epithelium at stage 1 (AR:  $68.47 \pm 10.2\%$ ; ER:  $65.02 \pm 9.2\%$ ) and 2 (AR:  $60.22 \pm 12.2\%$ ; ER:  $52.24 \pm 9.1\%$ , Fig. 4a–d). Additionally, the Leydig and peritubular cells of active gonads ( $63.15 \pm 7.5\%$ ) showed a slightly positive signal for AR (Fig. 4a and b). However, ER was detected in spermatogonia, Sertoli and Leydig cells as well as in interductal connective tissue cells of stage 0 ( $45.73 \pm 3.9\%$ ). The visualization of PR was successful in spermatogonia (Fig. 4e) of all three stages, but did not display noticeable differences between any of them (data not shown). The Sertoli cells showed a PR-positive staining only in stage 0.

The enzymes of steroid biosynthesis were present in active (Fig. 4g–j) and intermediate status, notably by means of  $17\beta$ -HSD-2 expression in Sertoli cells (stage 1: 80%; stage 2: 95%) and  $3\beta$ -HSD expression in spermatocytes (stage 1: 70%; stage 2: 55%) and Leydig cells (stage 1: 40%; stage 2: 59%). The positive reaction on  $17\beta$ -HSD-2 and  $3\beta$ -HSD declined in the non-active form/in stage 0.

The remarkable findings in epididymides were AR- and ER-positive ciliated and non-ciliated cells in the epithelium of the efferent ducts of stage 1 (AR:  $70.66 \pm 9.8\%$ ; ER:  $67.92 \pm 8.5\%$ ) and 2 (AR:  $63.07 \pm 11.2\%$ ; ER:  $59.81 \pm 6.5\%$ , Fig. 4b and d). PR was verified in the epithelial cells of Rete testis and in the interductal connective tissue cells (Fig. 4f) at all three stages.

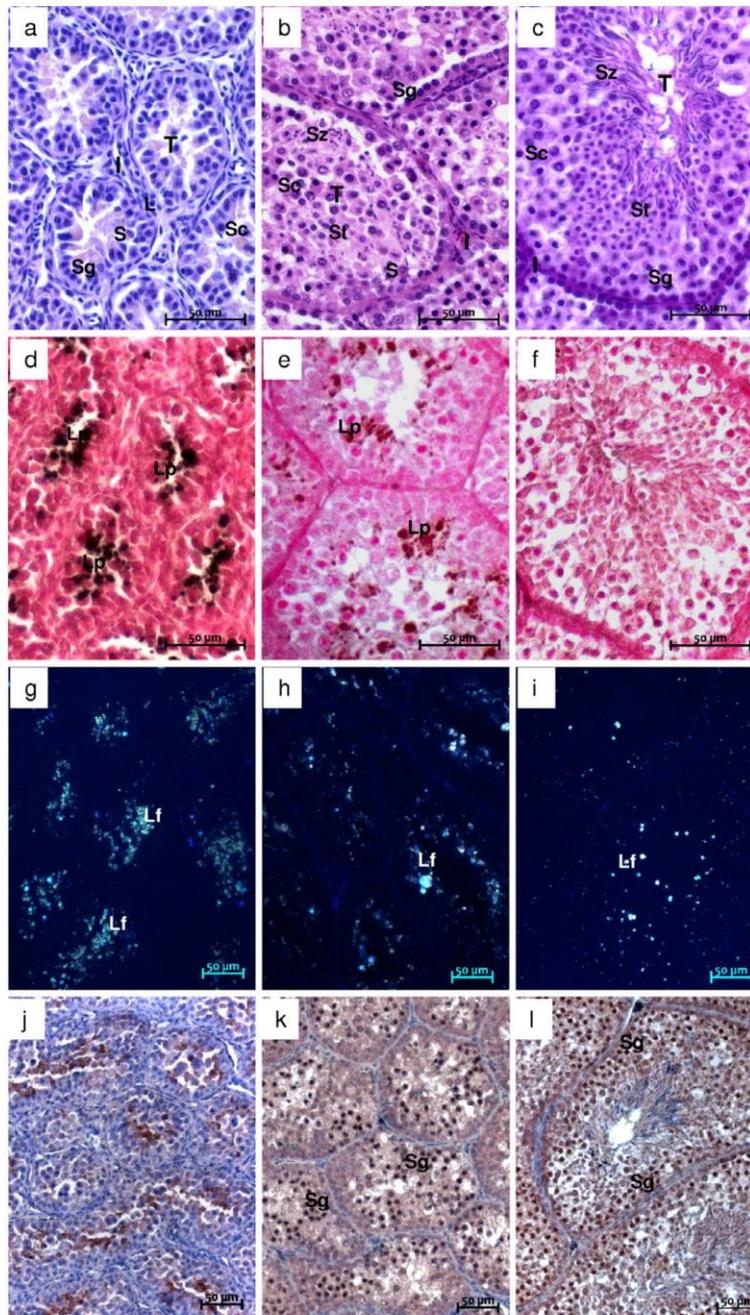
The epithelium of all active and intermediate efferent ducts as well as the cilia of ciliated cells were positive for  $3\beta$ -HSD (Fig. 4h), while 70% of the non-active epididymides detected no signal.

The nuclear Ki67-antigen is a marker for proliferating cells. The presence of Ki67 correlated with the rate of cell proliferation in the tissue investigated and differed significantly contingently on the reproductive status (Fig. 3j–l). Active and intermediate forms showed positive staining in the basal cells of the tubules, mainly spermatogonia (active:  $38.67 \pm 5.29\%$ ; intermediate:  $32.40 \pm 7.88\%$ ). The non-active states displayed no or less ( $6.01 \pm 8.03\%$ ) staining.

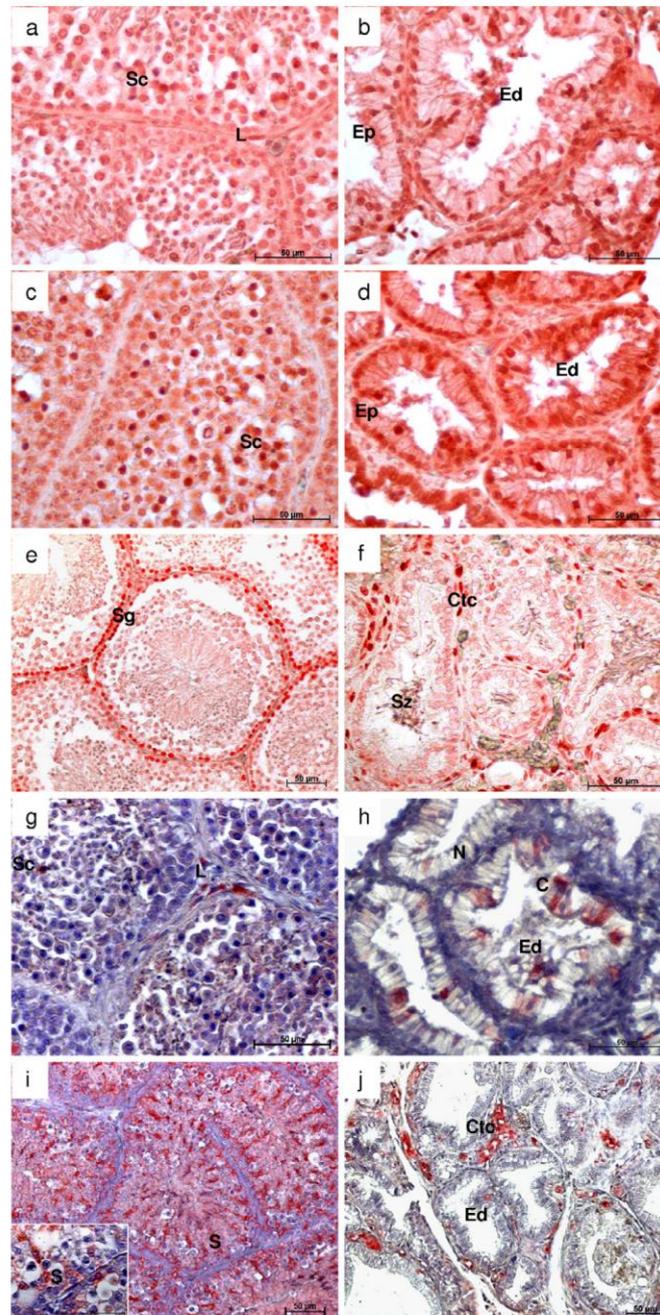
## 4. Discussion

### 4.1. Morphological aspects

In this study, active and non-active testes were easier to determine macroscopically than the intermediate stages; however, Hänse et al. [25] reported difficulties for the endoscopic evaluation of macroscopically non-active gonads: histology often displayed a more advanced stage of spermatogenesis. These differences might



**Fig. 3.** Morphological analysis of the budgerigars' testes. (a)–(c) HE staining, 400 $\times$ . Non-active testis (a) with 2–4 cell layers in interstitial tissue, maximum 4 in germinative epithelium containing spermatogonia, Sertoli cells and spermatocytes. Intermediate (b) form with varieties in the number of interstitial (1–4) and tubular cell layers (4–10). Active status (c) with 1–2 interstitial cell layers, 8–10 in germinative epithelium consisting all types of germ cells, spermatozoa arranged in “spike-stadium”. (d)–(f) Sudan black staining, 400 $\times$ . Non-active (d) and intermediate (e) testes with black to brown lipid masses in the tubular centres, active form (f) with negative staining. (g)–(i) DAPI-fluorescence, 200 $\times$ . Notable fraction of yellow auto-fluorescent lipofuscin in non-active (g) and intermediate (h) gonads. Active status (i) with less auto-fluorescence. Blue auto-fluorescence caused by other lipoids, like cholesterol. (j)–(l) Ki67 staining, 200 $\times$ . No nuclear signal can be detected in non-active status (j). The centres of the tubules show an unspecific reaction on Ki67 caused by lipofuscin. Positive brown nuclei (Spermatogonia) are located in the basal part of the germinative epithelium in intermediate (k) and active (l) status. Labels for testis: Tubule (T), Interstitial tissue (I), Spermatogonia (Sg), Spermatocytes (Sc), Spermatids (St), Spermatozoa (Sz), Sertoli cells (S), Leydig cells (L), Lipids (Lp), Lipofuscin (Lf).



**Fig. 4.** Immunocytochemical analysis of active testes (a, c, e, g, i) and epididymides (b, d, f, h, j) of budgerigars. (a and b) Androgen receptor AR, 400 $\times$ . Nuclear signal in spermatocytes and Leydig cells of the testis (a) and in epithelial cells of the efferent ducts, consisting of ciliated cells (apically located nuclei) and non-ciliated/principal cells (basally located nuclei), (b). (c and d) Oestrogen receptor ER, 400 $\times$ . Positive red staining in spermatocytes (c) and epithelium of the efferent ducts (d). (e and f) Progesterone receptor PR, 200 $\times$ . Nuclear signal in spermatogonia (e) and interductal connective tissue cells (f). (g and h) 3 $\beta$ -HSD, 400 $\times$ . The positive red signal is localized in the cytoplasm of the Leydig cells and spermatocytes of active testis (g) and in the ciliated cells and cilia of the efferent ductal epithelium (h). (i and j) 17 $\beta$ HSD-2, 200 $\times$ . Testis (i) with positive red staining in Sertoli cells (enhanced image below left, 1000 $\times$ ) and epididymis (j) with positive interductal connective tissue cells. Labels for testis: Spermatogonia (Sg), Spermatocytes (Sc), Spermatozoa (Sz), Sertoli cells (S), Leydig cells (L). Labels for epididymis: Efferent duct (Ed), Epithelium (Ep), Interductal connective tissue cells (Ctc), Ciliated cells (C), Non-ciliated/principal cells (N).

be due to the experimental setting (endoscopy vs. in situ examination during dissection).

We confirmed the significant increases in testicular size and weight subject to the testicular activity, published for poultry [32] and parrots [24,55,62].

Our results concerning interstitial and tubular dimensions correspond to the findings of various authors [24,27,33]. Apart from the fact that Samour [62] described the interstitium as getting three times thicker in the intermediate stage than in the non-active stage, his investigations also coincide with the current study.

In birds with distinct breeding cycles, three well-defined phases in the testis can be identified: regeneration, acceleration and culmination [42,62]. Even though the budgerigar is known as an opportunistic breeding bird [55], these three phases correspond with the three reproductive states assessed in this study. Although some authors divide the testicular cycle into 5 [24,27], 7 [10] or 9 [29] phases, these are also based on the structure of germinative epithelium and the presence or absence of spermatozoa. In addition, the mitotic activity of germ cells, obtained by the proliferation marker Ki67, is important for gonadal development and the definition of the reproductive status, as described for various mammals [40,75]. However, this is the first report about Ki67 activity in avian testes and this marker was used for their classification concerning the reproductive stage.

The lipid masses in the tubular centres of non-active and intermediate gonads, predominantly identified as lipofuscin, were also mentioned as cholesterol-positive lipoidal material in Sertoli cell cytoplasm during the regeneration phase [42] and acceleration phase [27]. The absence of lipofuscin in active testes disagrees with the detection of lipid droplets in Sertoli cells during the stage of full spermatogenesis [27], which may be due to the different experimental setting (electron vs. light microscopy). The fact that lipid portion of lipofuscin consists, amongst other things, of cholesterol [13] supports the assumption that the lipid content may reflect a phase of steroid biosynthesis. Additionally, cholesterol (known as a steroidogenic precursor) and other lipoids show a blue auto-fluorescence [12] and blue auto-fluorescent particles were found in the gonadal tubules. The accumulation of lipofuscin is a normal part of senescence and has been shown in mammalian and aquatic organisms to have a linear correlation with age [66]. Marshall [45] describes the presence of lipoidal material in the seminiferous tubules as evidence of degeneration. These opinions notwithstanding, over one third of the non-active and intermediate budgerigars in our study were young (<2 years of age). In fact, the lipofuscin-containing masses as well as the blue auto-fluorescent particles in the tubular centres of non-active gonads might be due to a nonutilization of lipid, at this phase of the reproductive cycle, in the elaboration of products, such as steroids, as presented by Aire [1,2]. This study as well as former investigations [71] showed that cells in non-active testes were devoid of 3 $\beta$ - and 17 $\beta$ -HSD activity and therefore may be incapable of steroidogenesis, so the origin of the lipid droplets in these cells may be the end products of lysosomal activities. Our results emphasize the coherency of testicular lipid content and steroidogenesis, previously described in poultry [1,2], amphibians [63] and mammals [51]. In addition, the increase of lipofuscin in postmitotic aged cells compared to young or dividing cells in rat testes [30] coincides with our findings concerning Ki67 in the non-active stages. We suppose that those testes with a stronger reaction to DAPI than to Sudan black have a lipofuscin composition dominated by proteins instead of lipids. Additionally, it has to be assumed that the testicular tubules may contain other lipids than lipofuscin which are not detected by our methods.

The gross evaluation of testes morphology would be inadequate in assessing reproductive status, because it provides too inaccurate results, as confirmed by Gartrell [24] and Hänse et al. [25]. Each ancillary histological technique or measurement helps to create a

more precise impression of testicular activity. But morphology per se offers limited information about gonadal function, so that additional immunocytochemistry has to be consulted.

#### 4.2. Endocrinological aspects

This is the first evidence of immunocytochemical detection of steroid receptors and steroid-metabolizing enzymes in parrots. Therefore, we were only able to compare our results with equivalent reports in mammals or other avian species, especially poultry and passerine birds. In these avian species, immunocytochemical studies have been published simply about various steroid receptors and HSDs in other organs than testis (basically brain, e.g. [4]), apart from the confirmation of AR in testes and epididymides of roosters and drakes [14,67] and ER in epididymides of roosters [37]. Other authors' investigations are only based on the analysis of peripheral steroid hormone levels or gene expression of steroid receptors and enzymes (e.g. [69,72]).

In budgerigars' testes, the active status expressed AR, ER and 3 $\beta$ -HSD in spermatoocytes and Leydig cells (except ER). This is the first study that has detected ER in the gonads of a male bird and our results coincide with previous findings in various mammals [34,35]. 3 $\beta$ -HSD, performing the biosynthesis of the  $\Delta^4$ -ketosteroids progesterone and androstenedione [74], has been demonstrated in interstitial tissue and tubules of roosters [56] and in Leydig cells of juvenile ostriches [44]. Interestingly, juvenile ostriches expressed this steroid-metabolizing enzyme during all phases of the testicular cycle. The fact that budgerigars displayed 3 $\beta$ -HSD only in the active and intermediate stages could be explained by species-specific differences in enzyme expression.

The cellular expression of AR in avian testes is still a matter of debate. Nastiuk and Clayton [48] found AR in the Sertoli cells of canaries, Shanbhag and Sharp [67] detected it in the Leydig cells of chickens, while Dornas et al. [14] described the receptor in Sertoli and Leydig cells in poultry. So far, there has been no report about AR-positive germ cells in avian testes. Therefore, the regulation of spermatogenesis is supposed to be similar to mammals, because androgens influence testicular somatic cells rather than acting directly on germ cells [14]. This study provides evidence about a direct influence of androgens on the germinal epithelium of birds, due to the expression of AR and 3 $\beta$ -HSD in spermatoocytes. The cellular-specific differences in AR expression in the three reproductive states suggest different sensitivity to androgens.

In addition, a positive correlation has been demonstrated between testis size and the intensity of testosterone production in many avian species [23,32]. This was confirmed by our results concerning the active gonads of budgerigars with large testes and high expression levels of AR and testosterone-synthesizing enzymes.

In active and intermediate stages, the epididymal epithelium showed that ciliated and non-ciliated cells were AR- and ER-positive, while only the ciliated cells including cilia expressed 3 $\beta$ -HSD. Tetzlaff [70] also described 3 $\beta$ -HSD activity in efferent ductules and in the epididymal duct of Peking ducks (*Anas platyrhynchos* L.) during the reproduction phase. The occurrence of AR in the efferent ducts is in agreement with previous findings for poultry [14,67] and mammals [59,76]. Unlike the budgerigar, poultry also displayed AR in non-active epididymides [67] and the ciliated cells did not express this receptor [14]. Epididymal functions such as like protein expression, fluid reabsorption [5], sperm concentration and maturation [19] may be not only regulated by androgens but also by oestrogens. This is similar to mammal species, where the efferent ducts are more sensitive to oestrogen than androgen [26,50]. In addition, there is a correlation to the efferent ducts of poultry, showing oestrogen formation from testosterone, performed by P450 aromatase [36]. Further investigations should clarify the presence of P450 aromatase in the testis, in correlation to

our detection of ER in spermatocytes. Rochester et al. [57] showed disrupted testis morphology in zebra finches after estradiol benzoate application, so the presence of ER in the testis must be implied. Nevertheless, for the budgerigar, we cannot support the theory that testicular development is mainly regulated by oestrogens (Furuya et al. [22] for the domestic chicken), but there might be species-specific variations in steroid responsibility according to breeding pattern and environmental conditions.

In active and intermediate epididymides, the expression of PR and 17 $\beta$ -HSD-2 was limited to the interductal connective tissue cells. This connective tissue might contain fibroblast-like, precursor Leydig cells for the replacement of degenerated ones in the recrudescence phase [44]. Therefore, similar to mammals, progesterone could be a stimulator of Leydig cell steroidogenesis [60]. 17 $\beta$ -HSD-2, published as being involved in neurosteroidogenesis in the avian brain [46], detects that these connective tissue cells are part of androgen biosynthesis. Because of the up-regulation of 17 $\beta$ -HSD-2 in Sertoli cells of active and intermediate testes, these cells also might be involved in steroidogenesis, though there have not yet been any clear statements for avian sustentacular cells [33,38].

Concerning PR-expression in testis, this is the first evidence of PR in the gonads of male birds. The receptor has only been described in the brain of ring doves [39]. Compared to mammals, our findings are in agreement with the testes of immature and mature boars [34].

Comparing the intermediate to the active stages, similar expression patterns are conspicuous. We consider the intermediate phase similar to acceleration, preparing the active stage with full spermatogenesis. In this connection, it has to be noted that phases 1 and 2 differ less in endocrinological than in morphological terms.

In contrast, the non-active status displayed important differences to the other two phases, most notably the decline of steroid-metabolizing enzymes. The non-active phase is a phase of down-regulated androgen biosynthesis, also described for other bird species [11,39,47].

Although steroid receptors are expressed, as demonstrated for AR, ER and PR in non-active mammal gonads [34,35] and for AR in quiescent epididymides in poultry [67], this study shows that HSDs play an important role for gonadal activity. They might promote the activation of steroid receptors in a ligand-independent manner [52] or modulate them via matrix metalloproteinases (MMPs, Li et al. [41]). Thus, the presence of these steroid-metabolizing enzymes is not only important for steroidogenesis but also for the initiation of androgen, oestrogen and progesterone receptors [16].

## 5. Conclusions

In conclusion, we have successfully established several markers for repeatable immunocytochemical methods to investigate the reproductive situation of male *Psittaciformes* and, combined with histology, to define three testicular activity states. This study provides basic information about local steroidogenesis. Our results have to be compared with the validation of peripheral steroid secretion (endocrine analysis of blood, saliva or faeces) to offer practical, less invasive alternatives to endoscopy, especially concerning endangered animals.

### Role of the funding source

This study was supported by the German Research Foundation (DFG), DFG EI 333/12-2 and KR 1732-5-1.

The DFG is the self-governing organisation for science and research in Germany. It serves all branches of science and the humanities. In organisational terms, the DFG is an association un-

der private law. Its membership consists of German research universities, non-university research institutions, scientific associations and the Academies of Science and the Humanities. The DFG receives the large majority of its funds from the states and the Federal Government, which are represented in all Grants Committees. At the same time, the voting system and procedural regulations guarantee science-driven decisions.

The role of the DFG is confined to financial support of this study, the organisation was neither involved in study design, nor in the collection, analysis, and interpretation of data, in the writing of the report, and in the decision to submit the paper for publication.

### Disclosure statement

All authors disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organisations within three (3) years of beginning the work submitted that could inappropriately influence (bias) their work. This disclosure statement comprises employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

### Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Thomas Scholzen (Research Centre Borstel) for his generous gift of the Ki67 antibody as well as Mrs. Sohr and Mrs. Tätzner for their technical assistance.

### References

- [1] T.A. Aire, Cyclical reproductive changes in the non-ciliated epithelia of the epididymis of birds, *Anat. Histol. Embryol.* 31 (2002) 113–118.
- [2] T.A. Aire, Morphological changes in the efferent ducts during the main phases of the reproductive cycle of birds, *J. Morphol.* 253 (2002) 64–75.
- [3] D.R. Ardia, D.R. Broughton, M.J. Gleicher, Short-term exposure to testosterone propionate leads to rapid bill color and dominance changes in zebra finches, *Horm. Behav.* 58 (3) (2010) 526–532.
- [4] J.A. Askew, G.C. Georgiou, P.J. Sharp, R.W. Lea, Localization of progesterone receptor in brain and pituitary of the ring dove: influence of breeding cycle and estrogen, *Horm. Behav.* 32 (1997) 105–113.
- [5] J.M. Bahr, M. Dalponte, S. Janssen, D. Bunick, M. Nakai, Ion transporters for fluid reabsorption in the rooster (*Gallus domesticus*) epididymal region, *Anim. Reprod. Sci.* 95 (2006) 331–337.
- [6] J. Balthazart, A. Foidart, E.M. Wilson, G.F. Ball, Immunocytochemical localization of androgen receptors in the male songbird and quail brain, *J. Comp. Neurol.* 317 (4) (1992) 407–420.
- [7] U. Bauchinger, T. Van't Hof, H. Biebach, Testicular development during long-distance spring migration, *Horm. Behav.* 51 (2007) 295–305.
- [8] M.D.C. Belle, R.W. Lea, Androgen receptor immunolocalization in brains of courting and brooding male and female ring doves (*Streptopelia risoria*), *Gen. Comp. Endocrinol.* 124 (2001) 173–187.
- [9] BirdLife International, The BirdLife Checklist of the Birds of the World, with Conservation Status and Taxonomic Sources, Version 2, 2009. Available from: <[http://www.birdlife.org/datazone/species/downloads/BirdLife\\_Checklist\\_Version2.zip](http://www.birdlife.org/datazone/species/downloads/BirdLife_Checklist_Version2.zip)> [xls zipped 1 MB] on 19 April 2010.
- [10] B.D. Blanchard, The white-crowned sparrows (*Zonotrichia leucophrys*) of the Pacific seaboard: environment and annual cycle, *Univ. Calif. Publ. Zool.* 46 (1941) 1–77.
- [11] J. Blas, L. López, A. Tanferna, F. Sergio, F. Hiraldo, Reproductive endocrinology of wild, long-lived raptors, *Gen. Comp. Endocrinol.* 168 (1) (2010) 22–28.
- [12] D. Boerner, Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Lipoiden, *Protoplasma* 41 (2) (1951) 168–177.
- [13] U.T. Brunk, A. Terman, Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function, *Free Radic. Biol. Med.* 33 (5) (2002) 611–619.
- [14] R.A. Dornas, A.G. Oliveira, M.O. Dias, G.A. Mahecha, C.A. Oliveira, Comparative expression of androgen receptor in the testis and epididymal region of roosters (*Gallus domesticus*) and drakes (*Anas platyrhynchos*), *Gen. Comp. Endocrinol.* 155 (1) (2008) 773–779.
- [15] A. Einspanier, A. Bielefeld, J.H. Kopp, Expression of the oxytocin receptor in relation to steroid receptors in the uterus of a primate model the marmoset monkey, *Hum. Reprod. Update* 4 (5) (1998) 634–646.
- [16] A. Einspanier, K. Lieder, B. Husen, K. Ebert, S. Lier, R. Einspanier, E. Unemori, M. Kemper, Relaxin supports implantation and early pregnancy in the marmoset monkey, *Ann. NY Acad. Sci.* 1160 (2009) 140–146.
- [17] C.J. Erickson, Induction of ovarian activity in female ring doves by androgen treatment of castrated males, *J. Comp. Physiol. Psychol.* 71 (1970) 210–215.

- [18] C.J. Erickson, J.B. Hutchinson, Induction of nest-materials collecting in male Barbary doves by intracerebral androgen, *J. Reprod. Fertil.* 50 (1977) 9–16.
- [19] P. Esponda, J.M. Bedford, Surface of the rooster spermatozoon changes in passing through the Wolffian duct, *J. Exp. Zool.* 234 (1985) 441–449.
- [20] H.H. Feder, A. Storey, D. Goodwin, C. Reboulleau, R. Silver, Testosterone and "5 $\alpha$ -dihydrotestosterone" levels in peripheral plasma of male and female ring doves (*Streptopelia risoria*) during the reproductive cycle, *Biol. Reprod.* 16 (1977) 666–677.
- [21] F. Freking, T. Nazairians, B.A. Schlinger, The expression of the sex steroid synthesizing enzymes CYP11A1, 3 $\beta$ -HSD, CYP17, and CYP19 in Gonads and Adrenals of adult and developing zebra finches, *Gen. Comp. Endocrinol.* 119 (2000) 140–151.
- [22] M. Furuya, K. Adachi, S. Kuwahara, K. Ogawa, Y. Tsukamoto, Inhibition of male chick phenotypes and spermatogenesis by Bisphenol-A, *Life Sci.* 78 (2006) 1767–1776.
- [23] L.Z. Garamszegi, M. Eens, S. Hurtrez-Boussès, A.P. Møller, Testosterone, testes size, and mating success in birds: a comparative study, *Horm. Behav.* 47 (2005) 389–409.
- [24] B.D. Gartrell, Assessment of the reproductive state in male swift parrots (*Lathamus discolor*) by testicular aspiration and cytology, *J. Avian Med. Surg.* 16 (3) (2002) 211–217.
- [25] M. Hänse, V. Schmidt, S. Schneider, A. DellaVolpe, M.E. Krautwald-Junghans, Comparative examination of testicular biopsies and influence on semen characteristics in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*), *J. Avian Med. Surg.* 22 (4) (2008) 300–309.
- [26] R.A. Hess, D. Bunick, K.H. Lee, J. Bahr, J.A. Taylor, K.S. Korach, D.B. Lubahn, A role for oestrogens in the male reproductive system, *Nature* 390 (1997) 509–512.
- [27] P.N. Humphreys, Ultrastructure of the budgerigar testis during a photoperiodically induced cycle, *Cell Tissue Res.* 159 (4) (1975) 541–550.
- [28] IUCN, IUCN Red List of Threatened Species, Version 2010.1, <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>, downloaded on 19 April 2010.
- [29] R.C. Jones, M. Lin, Spermatogenesis in birds, *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* 15 (1993) 233–264.
- [30] T. Jung, N. Bader, T. Grune, Lipofuscin: formation, distribution, and metabolic consequences, *Ann. NY Acad. Sci.* 1119 (2007) 97–111.
- [31] I. Kanda, Y. Akazome, O. Ogasawara, T. Mori, Expression of Cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase during embryogenesis in chicken adrenal glands and gonads, *Gen. Comp. Endocrinol.* 118 (2000) 96–104.
- [32] S. Kim, H.H. Yang, Seasonal changes of testicular weight, sperm production, serum testosterone release in Korean ring-necked pheasants (*Phasianus colchicus karpowii*), *J. Vet. Med. Sci.* 63 (2) (2001) 151–156.
- [33] J.D. Kirby, D.P. Froman, Reproduction in male birds, in: G.C. Whitton (Ed.), *Sturkie's Avian Physiology*, Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, 2000, pp. 597–615, fifth ed.
- [34] C. Kohler, A. Riesenbeck, B. Hoffmann, Age-dependent expression and localization of the progesterone receptor in the boar testis, *Reprod. Domest. Anim.* 42 (2007) 1–5.
- [35] L. Konrad, M.A. Weber, S. Groos, M. Albrecht, G. Aumüller, Paracrine interaction in testicular somatic cells, *Ital. J. Anat. Embryol.* 103 (4 Suppl. 1) (1998) 139–152.
- [36] S. Kwon, R.A. Hess, D. Bunick, H. Nitta, L. Janulis, Y. Osawa, J.M. Bahr, Rooster testicular germ cells and epididymal sperm contain P450 aromatase, *Biol. Reprod.* 53 (1995) 1259–1264.
- [37] S. Kwon, R.A. Hess, D. Bunick, J.D. Kirby, J.M. Bahr, Estrogen receptors are present in the epididymis of the rooster, *J. Androl.* 18 (1997) 378–384.
- [38] P.E. Lake, Male genital organs, in: A.S. King, J. McLelland (Eds.), *Form and Function in Birds*, vol. 2, Academic Press, London, 1981, pp. 1–61.
- [39] R.W. Lea, J.A. Clarke, K. Tsutsui, Changes in central steroid receptor expression, steroid synthesis, and dopaminergic activity related to the reproductive cycle of the ring dove, *Microsc. Res. Tech.* 55 (2001) 12–26.
- [40] N. Lei, K.I. Hornbaker, D.A. Rice, T. Karpova, V.A. Agbor, L.L. Heckert, Sex specific differences in mouse DMRT1 expression are both cell type- and stage dependent during gonad development, *Biol. Reprod.* 77 (2007) 466–475.
- [41] Y. Li, A. Isomaa, A. Pulkka, R. Herva, H. Peltoketo, P. Viikko, Expression of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, P450 aromatase, and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase types 1, 2, 5 and 7 mRNAs in human early and mid-gestation placentas, *Placenta* 26 (5) (2005) 387–392.
- [42] B. Lofts, R.K. Murton, Reproduction in birds, in: D.S. Farner, J.R. King (Eds.), *Avian Biology*, vol. 3, Academic Press, London and New York, 1973, pp. 1–107.
- [43] M.C. Madekurozwa, A study of the immunohistochemical localization of the progesterone, oestrogen receptors in the magnum of the immature ostrich, *Struthio camelus*, *Anat. Histol. Embryol.* 31 (2002) 317–320.
- [44] M.C. Madekurozwa, T.S. Chapvepi, S. Matema, K.J. Teerds, Relationship between seasonal changes in spermatogenesis in the juvenile ostrich (*Struthio camelus*) and the presence of the LH receptor and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, *Reproduction* 123 (2002) 735–742.
- [45] A.J. Marshall, On the function of the interstitium of the testes, *Q. J. Microsc. Sci.* 90 (1949) 265–280.
- [46] M. Matsunaga, K. Ukena, K. Tsutsui, Androgen biosynthesis in the quail brain, *Brain Res.* 948 (2002) 180–185.
- [47] J.R. Millam, Reproductive management of captive parrots, *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 2 (1) (1999) 93–110.
- [48] K.L. Nastiuk, D.F. Clayton, Seasonal and tissue specific regulation of canary androgen receptor messenger ribonucleic acid, *Endocrinology* 134 (2) (1994) 640–649.
- [49] H. Nitta, J.I. Mason, J.M. Bahr, Localization of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the chicken ovarian follicle shifts from the theca layer to granulosa layer with follicular maturation, *Biol. Reprod.* 48 (1993) 110–116.
- [50] C.A. Oliveira, Q. Zhou, K. Carnes, R. Nie, D.E. Kuehl, G.L. Jackson, L.R. Franca, M. Nacai, R.A. Hess, ER function in the adult male rat: short- and long-term effects of the antiestrogen ICI 162,780 on the testis and efferent ductules, without changes in testosterone, *Endocrinology* 143 (2002) 2399–2409.
- [51] A.M. Orsi, C.A. Vicentini, S.M. Dias, S.C. Michelin, M.J. Viotto, Histochemical and structural characteristics of the testis of the vampire bat (*Desmodus rotundus rotundus*, Geoffroy, 1810), *Rev. Bras. Biol.* 50 (1) (1990) 221–228.
- [52] S.B. Pillai, L.C. Rockwell, O.D. Sherwood, R.D. Koos, Relaxin stimulates uterine edema via activation of estrogen receptors: blockade of its effects using ICI 162,780, a specific estrogen receptor antagonist, *Endocrinology* 140 (1999) 2426–2429.
- [53] T.E. Pitcher, P.O. Dunn, L.A. Whittingham, Sperm competition and the evolution of testes size in birds, *J. Evol. Biol.* 18 (2005) 557–567.
- [54] C.G. Pollock, S.E. Orosz, Avian reproductive anatomy, physiology and endocrinology, *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 5 (3) (2002) 441–474.
- [55] G. Pohl-Apel, R. Sossinka, E. Wyndham, Gonadal cycles of wild budgerigars *Melopsittacus undulatus* (*Psittaciformes: Psittacidae*), *Aust. J. Zool.* 30 (1982) 791–797.
- [56] V.D. Purohit, P.K. Basrur, M.K. Bhatnagar, Histochemical localization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the testes of chicken-pheasant hybrids, *Histochem. J.* 9 (3) (1977) 293–299.
- [57] J.R. Rochester, W. Forstmeier, J.R. Millam, Post-hatch oral estrogen in zebra finches (*Taeniopygia guttata*): is infertility due to disrupted testes morphology or reduced copulatory behavior?, *Physiol. Behav.* 101 (1) (2010) 13–21.
- [58] B. Romeis, Paraplasmatische Substanzen – Färbung mit Sudan und Scharlach, in: P. Böck (Ed.), *Mikroskopische Technik*, Auflage 17, Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1989, pp. 379–382.
- [59] C.E. Roselli, N.B. West, R.M. Brenner, Androgen receptor and 5 alpha-reductase activity in the ductuli efferentes and epididymis of adult rhesus macaques, *Biol. Reprod.* 44 (1991) 739–745.
- [60] M. Rossato, A. Nogara, M. Merico, A. Ferlin, C. Foresta, Identification of functional binding sites for progesterone in rat Leydig cell plasma membrane, *Steroids* 64 (1–2) (1999) 168–175.
- [61] J.H. Samour, H.D.M. Moore, I.T. Bailey, P.F. Watson, Annual testicular cycle in captive budgerigars (*Melopsittacus undulatus*), *J. Zool. Lond.* 212 (1987) 465–473.
- [62] J.H. Samour, The reproductive biology of the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*): semen preservation techniques and artificial insemination procedures, *J. Avian Med. Surg.* 16 (1) (2002) 39–49.
- [63] E. Sasso-Cerri, F.P. de Faria, E. Freymüller, S.M. Miraglia, Testicular morphological changes during the seasonal reproductive cycle in the bullfrog *Rana catesbeiana*, *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* 301 (1) (2004) 249–260.
- [64] T. Scholzen, E. Endl, C. Wohlenberg, S. van der Sar, I.G. Cowell, J. Gerdes, P.B. Singh, The Ki-67 protein interacts with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure, *J. Pathol.* 196 (2) (2002) 135–144.
- [65] F. Schütt, S. Davies, J. Kopitz, M. Boulton, F.G. Holz, A retinoid constituent of lipofuscin, A2-E, is a photosensitizer in human retinal pigment epithelial cells, *Ophthalmologe* 97 (10) (2000) 682–687.
- [66] S.S. Seehafer, D.A. Pearce, You say lipofuscin, we say ceroid: defining autofluorescent storage material, *Neurobiol. Aging* 27 (2006) 576–588.
- [67] B.A. Shanbhag, P.J. Sharp, Immunocytochemical localization of androgen receptor in the comb, uropygial gland, testis, and epididymis in the domestic chicken, *Gen. Comp. Endocrinol.* 101 (1996) 76–82.
- [68] R. Silver, C. Reboulleau, D.S. Lehrman, H.H. Feder, Radioimmunoassay of plasma progesterone during the reproductive cycle of male and female ring doves (*Streptopelia risoria*), *Endocrinology* 94 (1974) 1547–1554.
- [69] K.K. Soma, N.A. Alday, M. Hau, B.A. Schlinger, Dehydroepiandrosterone metabolism by 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase in adult zebra finch brain: sex difference and rapid effect of stress, *Endocrinology* 145 (4) (2004) 1668–1677.
- [70] G. Tetzlaff, 3 beta-Hydroxysteroid-dehydrogenases of the testis epididymis of the Peking duck (*Anas platyrhynchos* L.), *Acta Histochem.* 81 (1) (1987) 19–34.
- [71] M.D. Tingari, Histochemical localization of 3 $\beta$ - and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases in the male reproductive tract of the domestic fowl (*Gallus domesticus*), *Histochem. J.* 5 (1973) 57–65.
- [72] K. Tsutsui, M. Matsunaga, H. Miyabara, K. Ukena, Neurosteroid biosynthesis in the quail brain: a review, *J. Exp. Zool. Part A Comp. Exp. Biol.* 305 (9) (2006) 733–742.
- [73] K. Ukena, Y. Honda, Y. Inai, C. Kohchi, R.W. Lea, K. Tsutsui, Expression and activity of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^4$ - $\Delta^5$ -isomerase in different regions of the avian brain, *Brain Res.* 818 (1999) 536–542.
- [74] K. Ukena, Y. Honda, R.W. Lea, K. Tsutsui, Developmental changes in progesterone biosynthesis and metabolism in the quail brain, *Brain Res.* 898 (2001) 190–194.
- [75] C. Wyns, M. Curaba, B. Martinez-Madrid, A. Van Langendonck, W. François-Xavier, J. Donnez, Spermatogonial survival after cryopreservation and short-term orthotopic immature human cryptorchid testicular tissue grafting to immunodeficient mice, *Hum. Reprod.* 22 (6) (2007) 1603–1611.
- [76] L.J. Zhu, M.P. Hardy, I.V. Inigo, I. Huhtaniemi, C.W. Bardin, A.J. Moo-Young, Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative immunohistochemical study, *Biol. Reprod.* 63 (2000) 368–376.

**3.2 Publikation 2**

Susanne Reitemeier, Maria Hänse, Anke Hahn, Volker Schmidt, Katrin Steinbach-Sobiraj, Susanne Tätzner, Maria-Elisabeth Krautwald-Junghanns, Almuth Einspanier

**Antibody selection for immunocytochemical characterization of male reproductive system in *Psittaciformes***

Theriogenology. 2013. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.05.027.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Theriogenology

journal homepage: [www.theriojournal.com](http://www.theriojournal.com)

## Antibody selection for immunocytochemical characterization of the male reproductive system in *Psittaciformes*

Susanne Reitemeier<sup>a</sup>, Maria Hänse<sup>b</sup>, Anke Hahn<sup>a</sup>, Volker Schmidt<sup>b</sup>, Katrin Steinbach-Sobiraj<sup>b</sup>, Susanne Tätzner<sup>a</sup>, Maria-Elisabeth Krautwald-Junghanns<sup>b</sup>, Almuth Einspanier<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Physiological Chemistry, Veterinary Faculty, University of Leipzig, Leipzig, Germany

<sup>b</sup>Clinic for Birds and Reptiles, Veterinary Faculty, University of Leipzig, Leipzig, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 April 2013

Received in revised form 28 May 2013

Accepted 29 May 2013

#### Keywords:

Immunocytochemistry

Testes

Psittaciformes

Steroidogenesis

Relaxin family

Proliferation

### ABSTRACT

The success of breeding programs is limited by the sparse knowledge about endocrine regulation and biochemical reactions in the psittacine male tract. The immunocytochemical analysis of parrots' testicular tissues provides an insight into their reproductive system but is often hampered by the lack of reliable antibodies. In the present study, we tested a large panel of antibodies raised against steroid receptors, steroidogenic enzymes, relaxin peptides including their receptors, and proliferation markers on paraffin sections of testicular tissue from eight psittacine genera representing three continents. All investigated species displayed the tested markers in somatic and germ cells of testis and epididymis, even though cell distribution was partly heterogenous and in species-specific patterns. The 17 $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase-2, 3 $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase, and smooth muscle actin allowed the cross-species differentiation between active and nonactive gonads. The remaining steroidogenic enzymes, steroid receptors, relaxin peptides, and Ki67 proved to be suitable to define reproductive activity depending on the parrot species. Adapting immunocytochemical methods to different psittacines was successful, though various cellular expression patterns do not allow the transfer of results among different parrot species. However, the availability of a reliable repertoire of sexual markers is important to examine reproductive biology of psittacine birds.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

According to the International Union for Conservation of Nature [1] and Birdlife International [2], more than 130 out of approximately 370 living parrot species are listed as near-threatened or worse. In addition to numerous projects targeting the conservation of wild parrots, breeding programs of psittacine birds in captivity are maintained to increase their respective populations. Irrespective of various factors like constricted genetic diversity and

difficult pair bonding, the success of these projects also depends on substantiated knowledge about psittacine procreation.

Our previous study concentrated on the immunocytochemical detection of steroid-producing cells within the testis and epididymis in conjunction with gonadal histology—a reliable method to ascertain the actual reproductive status of male budgerigars (Buds) (*Melopsittacus undulatus*) [3]. We were able to provide valuable information about local steroidogenesis in male psittacine gonads. Nevertheless, additional special markers are required for these birds to provide a more thorough documentation describing gonadal function and hormonal control by initially demonstrating the local synthesis of various reproductive factors. This is fundamental for the peripheral detection of these factors in psittacine

\* Corresponding author. Tel.: 0049 341 97 38 100; fax: 0049 341 97 38 119.

E-mail address: [einspanier@vetmed.uni-leipzig.de](mailto:einspanier@vetmed.uni-leipzig.de) (A. Einspanier).

blood or feces, a less invasive method for fertility assessment compared with endoscopy or testicular biopsy.

Numerous immunocytochemical markers successfully used for the characterization of the mammalian reproductive tract are not established in avian species; especially psittacines are still scarcely investigated, e.g., the steroidogenic enzyme P450 aromatase represents mainly a marker for mammalian Leydig cells but also (subject to species and reproductive stage) for Sertoli, germ, and epididymal cells [4]. The only immunocytochemical demonstration in gonads of the rooster [5] requires a comparison with the localization of the enzyme in other avian species. The role of aromatase in the parrot's testes, in correlation with the previous detection of estrogen receptor (ER $\alpha$ ) in spermatocytes [3], has still to be clarified.

Different isoenzymes of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) were isolated in reproductive tissues of various mammal species [6–8]. Considering the avian situation, quail [9] and starling [10] brain and chicken ovary [11] displayed 17 $\beta$ -HSD expression. Whereas the first report about the upregulation of 17 $\beta$ -HSD type 2 in Sertoli cells of Buds [3] supports the thesis of androgen biosynthesis in avian Sertoli cells, the role of other 17 $\beta$ -HSD isoenzymes in the psittacine male tract remains unexplained.

The distribution of the relaxin (RLN) family peptides and their receptors in cells and tissues of the mammalian male tract is well-studied [12]; RLN represents a marker for Sertoli cells [13] and in combination with the RLN family peptide receptor (RXFP) 1 for Leydig cells [14]. Relaxin-like factor (RLF) and RXFP2 are basically expressed in mammalian Leydig cells [15]. References to the RLN peptides in aves are limited to the chicken ovary [16], testis [17,18], and the pigeon crop sac [19].

Morphological changes in the testes and the epididymides occur because of proliferation and apoptosis during reproductive activity and inactivity. Proliferation processes in the avian male tract were demonstrated in galliform Sertoli cells [20] and in psittacine germ cells [3]. Within the scope of mitotic activity of somatic and germ cell types, the situation in other parrot species requires more investigation. This also applies to the expression of contractile cytoskeletal proteins, especially the microfilament smooth muscle actin (SMA) found in the testicular tissues of galliform and anseriform birds [21–23]. Its function in psittacine male reproduction continues to remain a matter of interest.

The present study focused on two special objectives; first, to evaluate a spectrum of reproductive markers for the Bud as a model species for endangered *Psittaciformes* and second, to test the transferability of these established methods to other psittacine species.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and tissue preparation

For the detection of reliable markers to evaluate the reproductive status, testis samples of different psittacine species were examined. Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*, N = 45) and cockatoos (Coc; *Cacatuidae*; N = 12, including the genera *Nymphicus*, *Eolophus* and *Cacatua*)

were chosen as representatives for Australian species. The Congo African gray parrot (AGP, *Psittacus erithacus erithacus*, N = 6) was selected as Old World species and Amazon parrots (AP; genus *Amazona*, N = 6) and macaws (N = 6, including the genera *Ara* and *Cyanopsitta*) likewise as representatives of the New World species. Tissue samples were collected within the scope of routine necropsies at the Clinic for Birds and Reptiles in Leipzig. The experimental procedure of sample retrieving, tissue preparation and histochemical staining was performed as explicitly described in our previous publication [3].

### 2.2. Histological characterization of the reproductive status

Using the Axioskop 2 mot plus with magnification  $\times 400$  and the pictorial documentation system AxioVision (AxioVs 40 V 4.5.0.0, Carl Zeiss Imaging Solutions, Jena, Germany), the hematoxylin and eosin-stained gonadal samples were assigned to three different reproductive phases; nonactive, intermediate, and active stage. The criteria for the definition of a nonactive, intermediate, and active status were the quantity of germ cells (spermatids and spermatozoa) plus the interstitial and seminiferous tubular dimensions. The distance measurement of seminiferous tubules and interstitium in micrometers was conducted by scaling 10 fields of view per slide with magnification  $\times 200$ . Furthermore, the presence of melanin in the gonadal tissue was reported to examine a potential relation between testicular melanogenesis, seasonal changes in testicular morphology, and endocrine control of the gonads.

### 2.3. Immunocytochemistry

The immunocytochemical analyses were conducted by adhering to the established protocol [3]. To demask the nuclear markers (androgen receptor ([AR]-1, AR-2), ER $\alpha$ , and progesterone receptor [PR]), the slides were pretreated in citrate buffer (pH 6.0) at 120 °C using a steamer. The incubation with 0.0125% trypsin solution at 37 °C for 15 minutes and the endogenous peroxidase inhibition with 3% hydrogen peroxide was followed by staining the sections with a 2% alcoholic solution of Sudan black B (Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen, Germany) for 20 minutes. Because Sudan black B colors phospholipids, neutral fats, and sterols dark blue to black [24], this step was designed to mask an unspecific reaction of lipid accumulation in the seminiferous tubules (described in Reitemeier et al. 2011 [3]) with the primary antibody. To avoid nonspecific binding of the primary antibody, the tissue samples were incubated with pigeon plasma (1:100 dilution of Aqua bidest). Subsequently, the slides were reacted with the specific antibody (all specificities, dilutions, clone names, and providers are listed in Table 1) at room temperature for 2 hours. Washing in PBS was followed by incubation with Dako EnVision+ Dual Link System Peroxidase (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) for 45 minutes. The enzyme activity was visualized using the chromogenic substrate 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC) (AEC Substrate Kit for Peroxidase, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Finally, the tissue sections were covered with Immu-Mount (Thermo-Scientific, Pittsburgh, PA, USA).

**Table 1**  
List of markers used for the investigation of the reproductive status in male *Psittaciformes*.

Marker	Published literature	Provider <sup>a</sup>	Specificity/clone	Dilution	Antigen retrieval
<b>Steroid receptors</b>					
AR-1	[25,26]	A	pc (rabbit IgG)	1:50 (Bud 1:150)	h, t
AR-2	[27,28]	B	mc (mouse IgG); Clone 2F12	1:100	h, t
ER $\alpha$	[29]	C	mc (mouse anti-human IgG); Clone B10-A	1:100 (Bud 1:50)	h, t
PR	[30,31]	D	mc (mouse IgG); Clone PR10A9	1:50	h, t
<b>Steroidogenic enzymes</b>					
Aromatase	[32]	E	pc (rabbit anti- <i>Callithrix jacchus</i> IgG)	1:50	t
3 $\beta$ -HSD	[33,34]	E	pc (rabbit anti-H3BHSDP-5C)	1:4000 (AGP 1:1000; Ma 1:3000; AP 1:5000)	t
17 $\beta$ -HSD-1	[32]	E	pc (rabbit anti- <i>Callithrix jacchus</i> IgG)	1:50 (Bud 1:100)	t
17 $\beta$ -HSD-2	[9,35]	E	pc (rabbit anti- <i>Callithrix jacchus</i> IgG)	1:500 (AP 1:800; Bud 1:1250)	t
17 $\beta$ -HSD-7	[36,37]	E	pc (rabbit anti- <i>Callithrix jacchus</i> IgG)	1:1000 (Bud 1:250)	t
<b>Relaxin family</b>					
RXFP1	[29,36]	F	pc (rabbit IgG)	1:800	t
Relaxin	[29,36]	G	pc (rabbit anti-porcine)	1:1000 (Bud 1:3000)	t
RXFP2	[38,39]	F	pc (rabbit IgG)	1:800	t
Relaxin-like factor	[38,39]	E	pc (rabbit IgG)	1:600 (Bud: 1:400)	t
<b>Proliferation markers</b>					
Ki67	[40,41]	H	pc (rabbit IgG)	1:1000 (Bud 1:4000)	h
Smooth muscle actin	[42,43]	I	mc (mouse anti-human IgG); Clone 1A4	1:100 (Bud 1:500)	t

Particular dilutions are shown in parentheses.

Abbreviations: AGP, African gray parrot; AP, Amazon parrot; AR, androgen receptor; Bud, Budgerigar; ER, estrogen receptor; h, heat pretreatment; HSD, hydroxysteroid dehydrogenase; Ma, Macaw; mc, monoclonal; pc, polyclonal; PR, progesterone receptor; RXFP, relaxin family peptide receptor; t, trypsin pretreatment.

<sup>a</sup> Providers: A, Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA); B, Medac (Hamburg, Germany); C, Euromedex (Souffelweyersheim, France); D, Immunotech (Marseille, France); E, Pineda (Berlin, Germany); F, Prof. Dr. A. Einspanier (Institute of Physiological Chemistry, University of Leipzig, Leipzig, Germany); G, Prof. Dr. O.D. Sherwood (Department of Molecular and Integrative Physiology, University of Illinois, Urbana, IL, USA); H, Antibodies-online (Aachen, Germany); I, DakoCytomation (Carpinteria, CA, USA).

The detection of cytoplasmic steroidogenic enzymes (3 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$ -HSD type 1, 2, and 7), RLN family members (Relaxin, Relaxin-like-factor, RXFP-1, and RXFP-2), and SMA was performed similarly as for the nuclear markers, except for the heat pretreatment. Additionally, the visualization of the enzyme with AEC was followed by a counterstaining with Mayer's hematoxylin.

A slightly different method was used for the localization of aromatase. After an overnight reaction with primary antibody (see Table 1) at 4 °C, the slides were incubated with secondary antibody (polyclonal horse anti-mouse/rabbit IgG; H+L Biotin, Vector Laboratories) at room temperature for 30 minutes. Subsequently, the visualization was carried out using alkaline phosphatase standard (AK-5000; Vector Laboratories) and the chromogen Histo Red (AP-Substrate Kit; Linaris, Wertheim-Bettingen, Germany).

The double-indirect method for obtaining proliferation marker Ki67 (based on Scholzen et al. [40]) was previously specified [3]. Psittacine kidney, adrenal, ovary, and oviduct (steroid receptors, steroidogenic enzymes, and RLN family markers) and mice tumors (proliferation markers) were used as positive control tissue. The omission of the primary antibody and the incubation with IgG antibodies of irrelevant specificity served as negative controls.

The immunocytochemistry was interpreted using a light microscope (Axioskop 2 mot plus) with magnification  $\times 100$ ,  $\times 200$ , and  $\times 400$ . The distribution of all tested markers in the testicular and epididymal tissues was recorded.

#### 2.4. Statistical analysis

The results of the interstitial and seminiferous tubular measurement are presented in terms of mean values  $\pm$  SEM and statistically compared using the Mann-Whitney *U* Test. The level of significance was defined at  $P \leq 0.05$  (investigated via IBM SPSS Statistics 20).

**Table 2**  
Interstitial and seminiferous tubular dimensions in gonads of different psittacine species.

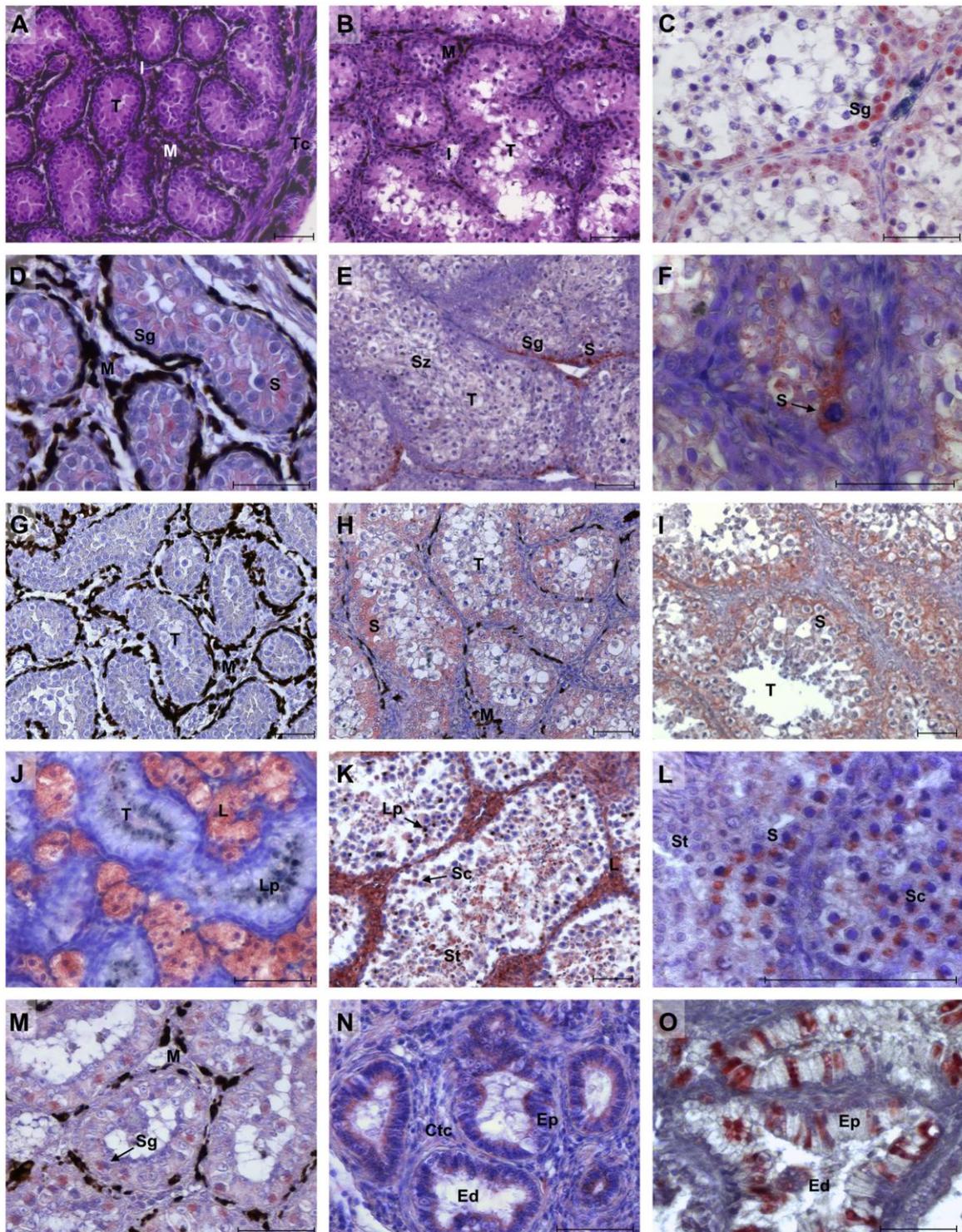
Species	NA	INT	A
Cockatoo <sup>a</sup> (N = 12)	T: 65.2 $\pm$ 10.3 I: 23.6 $\pm$ 5.7	T: 142.0 $\pm$ 26.0 I: 12.9 $\pm$ 5.3	T: 192.4 $\pm$ 43.5 I: 4.3 $\pm$ 1.6
African gray parrot (N = 6)	T: 72.1 $\pm$ 15.3 I: 19.0 $\pm$ 5.7	T: 130.7 $\pm$ 24.3 I: 9.2 $\pm$ 2.1	T: 199.9 $\pm$ 27.0 I: 2.8 $\pm$ 0.7
Macaw (N = 6)	T: 49.3 $\pm$ 10.1 I: 17.7 $\pm$ 4.0	T: 120.7 $\pm$ 16.4 I: 8.8 $\pm$ 1.7	T: 151.0 $\pm$ 14.2 I: 2.8 $\pm$ 1.0
Amazon parrot (N = 6)	T: 56.5 $\pm$ 10.6 I: 18.0 $\pm$ 2.2	T: 114.7 $\pm$ 17.8 I: 9.9 $\pm$ 2.5	T: 166.1 $\pm$ 36.9 I: 4.6 $\pm$ 1.7
Budgerigar <sup>b</sup> (N = 30)	T: 57.6 $\pm$ 10.8 I: 11.8 $\pm$ 4.1	T: 110.9 $\pm$ 28.2 I: 6.8 $\pm$ 3.7	T: 151.7 $\pm$ 30.2 I: 3.8 $\pm$ 1.2

I and seminiferous T dimensions ( $\mu\text{m}$ ; mean  $\pm$  SEM) in NA, INT, and A gonads of different psittacine species (distance measurement by scaling 10 fields per slide with magnification  $\times 200$ ). P values  $\leq 0.05$  are listed in the footnotes. The remaining P values exceeded the level of significance (data not shown).

Abbreviations: A, active; I, interstitial; INT, intermediate; NA, nonactive; T, tubular.

<sup>a</sup> T: INT versus A ( $P = 0.024$ ); I: INT vs. NA ( $P = 0.024$ ).

<sup>b</sup> T: INT versus A ( $P \leq 0.001$ ); INT versus NA ( $P \leq 0.001$ ); A versus NA ( $P \leq 0.001$ ); I: INT versus A ( $P = 0.004$ ); INT versus NA ( $P = 0.001$ ); A versus NA ( $P \leq 0.001$ ).



**Fig. 1.** Histological and immunocytochemical analysis of testes or epididymides of various psittacine species in different reproductive activity stages. (A) Hematoxylin and eosin staining, Yellow-Crested cockatoo (*Cacatua sulphurea*), nonactive testis: massive accumulation of dark brown melanocytes in testicular interstitium and tunica albuginea. (B) Hematoxylin and eosin staining, Galah cockatoo (*Eolophus roseicapilla*), intermediate testis: moderate accumulation of dark

2.5. Ethics

All psittacine tissues used for this study were obtained within the scope of routine necropsies at the Clinic for Birds and Reptiles. The birds either deceased or were euthanized because of various diseases, which did not affect the reproductive tract. No birds were sacrificed only for the purpose of this study. All study protocols were arranged and permitted according to the German law on animal experimentation.

3. Results

3.1. Histological analysis

3.1.1. Seminiferous tubules and testicular interstitium

The quantity of germ cells (spermatids and spermatozoa) was similar to the results determined for the Bud [3], so detailed data are not considered at this point. We reported significant variations (P values in Table 2) in tubular and interstitial dimensions between the three reproductive states of the Bud. In the other investigated species (Cocs, AGPs, macaws, and APs) the tubular dimensions also declined from active to nonactive status whereas the interstitial diameters did the opposite (see Table 2). Only the Cocs displayed significant dimension differences in tubules of intermediate versus active stage (P = 0.024) and in interstitium of nonactive versus intermediate stage (P = 0.024). Both the largest testicular tubules (192.4 ± 43.5 µm) in the active and the largest interstitium (23.6 ± 5.7 µm) in the nonactive status were presented by the Coc. The nonactive macaw's tubular (49.3 ± 10.1 µm) and the active AGPs interstitial (2.8 ± 0.7 µm) dimensions were the smallest observed.

3.1.2. Interstitial melanin

Melanin was observed in testicular interstitium and tunica albuginea of Cocs (nonactive and intermediate stage), but only distributed in form of pigment-containing cells or melanocytes in the genera *Eolophus* and *Cacatua*. The testes of genus *Nymphicus* (intermediate and active stage) displayed no melanin.

The Cocs, however, showed that the degree of melanin accumulation was higher in nonactive than in intermediate stage (Fig. 1A, B). One nonactive macaw (*Ara ararauna*) also exhibited black to brown pigmented cells in the interstitium, but to a lesser degree than in the Cocs' testes. The

absence or presence of melanin in the tunica albuginea was also visible macroscopically, because only the testes of genus *Eolophus* and *Cacatua* appeared brown to black, the remaining ones white-yellowish. No melanin was detectable in the gonads of the other parrot species.

3.2. Immunocytochemistry

The detailed results of the immunocytochemical analyses, reporting all positive cell types according to reproductive stage and psittacine species are summarized in Table 3. The main results are listed in the following paragraphs.

3.2.1. Steroid receptors

3.2.1.1. Androgen receptor. The steroid receptor AR-2 was undetectable in all species throughout all reproductive stages. Concerning the AR-1, intermediate and active macaws merely displayed positive testicular capsules. Nonactive macaws did not express the receptor. Apart from that, all species presented AR-1-positive germ cells independent of their sexual status. Remarkably, only the Coc showed no positive Leydig cell staining throughout all stages and its nonactive testis expressed AR-1 in Sertoli cells. Androgen receptor-1-positive efferent ductal epithelium (ciliated and nonciliated cells) and interductal connective tissue cells were detected in epididymides of active and intermediate Buds, Amazon, and African gray parrots (the latter also in the nonactive stage).

3.2.1.2. Estrogen receptor. The ERα was presented by germ cells of every species in all three phases. Leydig and epididymal cells were ERα-positive depending on species and reproductive status. Only nonactive Cocs, Buds, and APs displayed ERα-expressing Sertoli cells.

3.2.1.3. Progesterone receptor. Apart from nonactive macaws and APs, in which no positive staining for PR was noticed, all species showed PR-positive germ cells (Fig. 1C) in all reproductive stages. Intermediate Cocs and nonactive Buds and African gray parrots presented PR in Sertoli cells. Progesterone receptor-positive Leydig cells were merely observed in active Cocs and nonactive AGPs. The Bud was the only species in which PR was detected in epididymal epithelium and interductal connective tissue cells throughout all reproductive phases.

brown melanocytes in testicular interstitium. (C) Progesterone receptor, Scarlet Macaw (*Ara macao*), intermediate testis: progesterone receptor-positive nuclei of spermatogonia. (D) Aromatase, Yellow-Crested cockatoo, nonactive testis: red cytoplasmic signal in spermatogonia and Sertoli cells, interstitium with dark brown melanocytes. (E) 17β-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)-1, Spix's Macaw (*Cyanopsitta spixii*), active testis: positive staining of basal tubular cells (spermatogonia and Sertoli cells). (F) 17β-HSD-1, Spix's Macaw, active testis: positive Sertoli cell cytoplasm. (G) 17β-HSD-2, Yellow-Crested cockatoo, nonactive testis: no positive signal, interstitium with massive accumulation of dark brown melanocytes. (H) 17β-HSD-2, Galah cockatoo, intermediate testis: positive cytoplasmic reaction (red) of Sertoli cells, interstitium with moderate accumulation dark brown melanocytes. (I) 17β-HSD-2, Cuban Amazon (*Amazona leucocephala*), active testis: positive cytoplasmic reaction of Sertoli cells. (J) 17β-HSD-7, Blue-and-Yellow Macaw (*Ara ararauna*), nonactive testis: positive signal (red) in Leydig cells, moderate lipid accumulation in the tubular centers (visualized with Sudan black B). (K) 17β-HSD-7, cockatiel (*Nymphicus hollandicus*), active testis: cytoplasmic signal in germ and Leydig cells, detached lipids (visualized with Sudan black B) in the tubular centers. (L) 17β-HSD-7, budgerigar (*Melopsittacus undulatus*), active testis: positive spermatocytes and Sertoli cells. (M) Relaxin family peptide receptor (RXFP) 1, Galah cockatoo, nonactive testis: moderate positive staining of spermatogonia, interstitium with dark brown melanocytes. (N) RXFP1, Congo African gray parrot (*Psittacus erithacus erithacus*), nonactive epididymis: positive cytoplasmic reaction in epithelium and connective tissue cells of the efferent ducts. (O) RXFP1, budgerigar, active epididymis: red staining in cytoplasm of the efferent ductal epithelium. Bar, 50 µm. Ctc, interductal connective tissue; Ed, efferent duct; Ep, epithelium; I, interstitial tissue; L, Leydig cells; Lp, lipids; M, melanocytes; S, Sertoli cells; Sc, spermatocytes; Sg, spermatogonia; St, spermatids; Sz, spermatozoa; T, tubule; Tc, testicular capsule.

### 3.2.2. Steroidogenic enzymes

**3.2.2.1. Aromatase.** The steroidogenic enzyme aromatase was present in germ cells (Fig. 1D) and epididymal epithelium of every species in all sexual states (except no positive germ cells in nonactive AGPs). Whereas macaws displayed aromatase-expressing Sertoli cells in all stages, no positive staining was detected in Sertoli cells of APs. The visualization of the enzyme was successful in Leydig cells of almost every species and reproductive stage, with only intermediate and nonactive Cocs and active macaws exhibiting negative ones. All species expressed aromatase in epididymal tissue throughout all reproductive states, most of them in epididymal epithelium and in interductal connective tissue—with the exception of the Coc, which presented only aromatase-positive interductal connective tissue in all three stages.

**3.2.2.2.  $3\beta$ -HSD.** The active and intermediate testis samples of every parrot species revealed  $3\beta$ -HSD in Leydig cells and epididymal epithelium, and additionally in the nonactive ones of AGPs. Conspicuously, all nonactive gonads (except AGPs) displayed no reaction on the enzyme. Only active and intermediate macaws expressed  $3\beta$ -HSD in Sertoli cells. Apart from the Coc, all active and intermediate species presented germ cells positive for  $3\beta$ -HSD.

**3.2.2.3.  $17\beta$ -HSD-1.** Irrespective of the fact that  $17\beta$ -HSD-1 was not detectable in active Cocs and nonactive macaws and APs, all species displayed this enzyme in epididymal epithelium, independent of the reproductive status. The AGP was the only species with positive reactions in Sertoli and Leydig cells throughout all reproductive states. Intermediate and active AGPs, macaws, APs, and Buds showed  $17\beta$ -HSD-1 in germ cells. On the contrary, we observed  $17\beta$ -HSD-1-positive germ cells in intermediate and nonactive Cocs (Fig. 1E, F).

**3.2.2.4.  $17\beta$ -HSD-2.** All nonactive testes were negative for  $17\beta$ -HSD-2 (Fig. 1G), whereas all active and intermediate species expressed the enzyme in Sertoli (Fig. 1H, I) and epididymal epithelial cells. Only active Cocs showed an additional staining in germ cells and interductal connective tissue cells.

**3.2.2.5.  $17\beta$ -HSD-7.** Nonactive Buds were negative for  $17\beta$ -HSD-7. However, all species displayed enzyme-positive germ cells (except nonactive macaws and active APs) and Leydig cells in every reproductive status (Fig. 1J, L).

### 3.2.3. Relaxin family

**3.2.3.1. Relaxin receptor RXFP1.** The RLN receptor RXFP1 was not expressed in nonactive APs, whereas other species of this reproductive status demonstrated positive germ (Fig. 1M), Sertoli, and Leydig cells and epididymal cells (for species-specific differences, see Table 3). On the contrary, all active and intermediate stages showed a cross-species staining of germ and efferent duct epithelial

cells (Fig. 1N, O). Considering every species on its own, a different expression of RXFP1 was remarkable in intermediate and active stages versus the nonactive stage. For example, nonactive APs did not express the receptor at all, and active and intermediate ones displayed RXFP1 in somatic, germ, and epididymal cells. The same cellular distribution was demonstrated by Cocs of intermediate and active stage, whereas RXFP1-positive germ cells only occurred in the nonactive stage.

**3.2.3.2. Relaxin.** A comparable phenomenon was verifiable for RLN in macaws (Fig. 2A) and APs. Positive Sertoli cells were detected in active and intermediate macaws, whereas no staining occurred in nonactive ones. Amazon parrots of active and intermediate stage demonstrated positive germ and epididymal cells, whereas RLN was not verifiable at all in the nonactive stage. Cockatoos, AGPs, and Buds did not show such noticeable varieties of RLN expression between the reproductive states.

**3.2.3.3. Relaxin receptor RXFP2.** Concerning the main receptor for RLF, RXFP2, all active and intermediate phases were dominated by positive Leydig and efferent duct epithelial cells (Fig. 2B, C). Only Buds of intermediate stage did not express RXFP2 staining in Leydig cells. Nonactive Macaws and APs were conspicuous considering the lack of RXFP2-positive epididymal epithelium, whereas nonactive stages of Cocs had no RXFP2-expression in Leydig, and no expression in AGPs in germ cells.

**3.2.3.4. Relaxin-like factor.** A remarkable result was demonstrated in the analysis of RLF in Buds. This was the only species showing a correlation of positive stained cells for RLF and its receptor RXFP2 throughout all reproductive stages. Other species displayed this coherency merely in one stage (Cocs and AGPs in intermediate, APs in active stage). Another remarkable fact is that nonactive Cocs, AGPs, macaws, and APs expressed RLF in more different cell types than RXFP2. Figure 2D, E represent the positive cytoplasmic reaction of RLF in spermatogonia of a nonactive Coc and in spermatocytes, Sertoli, and Leydig cells of an active macaw.

### 3.2.4. Proliferation markers

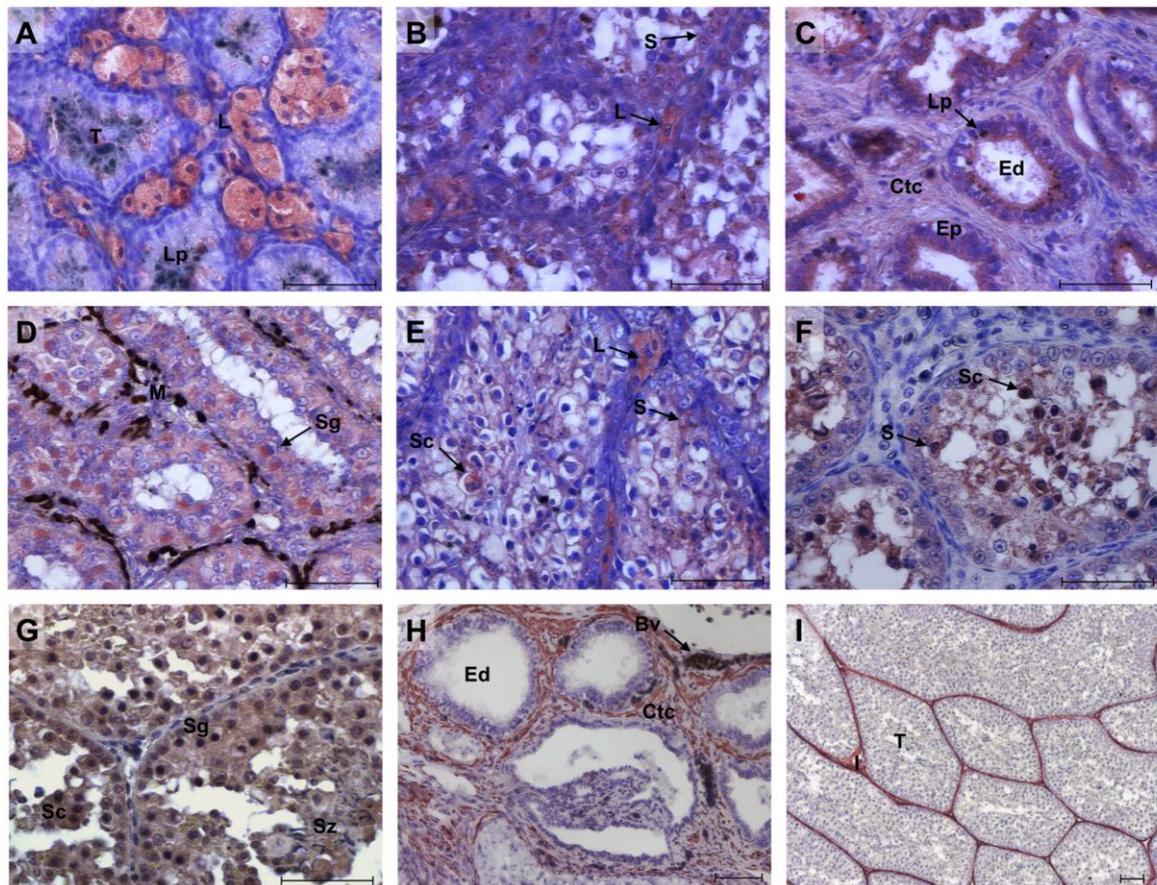
**3.2.4.1. Ki67.** The proliferation marker Ki67 did not occur in nonactive macaws and Buds. On the contrary, a cross-species positive staining of germ cells was verifiable in intermediate and active stage (Fig. 2F, G). Most species (except the Bud) demonstrated Sertoli cell expression in the intermediate stage (AGP also in the nonactive stage). Referring to the type of positive stained cells, an explicit difference between active and nonactive stage was proven in macaws, APs, and Buds.

**3.2.4.2. Smooth muscle actin.** The SMA expression is demonstrated in Figure 2H, I. Active and intermediate Cocs, AGPs, and macaws displayed SMA in germ cells and interductal connective tissue cells and in the testicular capsule, the peritubular tissue, and in blood vessels. In contrast,

**Table 3**  
Reaction of different antibodies on paraffin sections of psittacine testicular and epididymal tissue.

Psittacine species marker	Reproductive state	Cockatoo (N = 12)	African gray parrot (N = 7)	Macaw (N = 6)	Amazon parrot (N = 7)	Budgerigar (N = 45)
<b>Steroid receptors</b>						
AR-1	Active	GC	GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc, BV	Tc	GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc, BV	GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc
	Intermediate	GC	GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc, BV	Tc	GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc, BV	GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc
	Nonactive	S, GC	GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc, BV	(-)	GC	(-)
AR-2	Active	(-)	GC, L, Ed-Ctc, BV	GC, L, Ed-Ep	GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc, BV	GC, L, Ed-Ep
	Intermediate	GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc, BV	GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc, BV	GC, L, Ed-Ep	GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc, BV	GC, L, Ed-Ep
	Nonactive	S, GC, Ed-Ep, Ed-Ctc	GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc, BV	GC, L	S, GC, L	S, GC, L, Ed-Ctc
PR	Active	GC, L, Ed-Ctc	GC, BV	GC, L, Ed-Ep	GC, L, Ed-Ep, Tc	GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc
	Intermediate	S, GC	GC, Ed-Ep, Ed-Ctc, BV	GC, Ed-Ep	GC, Ed-Ep, Ed-Ctc	GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc
	Nonactive	GC	S, GC, L, Ed-Ep, BV	(-)	(-)	S, GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc
<b>Steroidogenic enzymes</b>						
Aromatase	Active	GC, L, Ed-Ep	GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc	S, GC, Ed-Ep	GC, L, Ed-Ep	GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc
	Intermediate	S, GC, Ed-Ep	S, GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc	S, GC, L, Ed-Ep	GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc	GC, L, Ed-Ep
	Nonactive	S, GC, Ed-Ep	S, L, Ed-Ep, Ed-Ctc	S, GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc	GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc	S, GC, L, Ed-Ep
3β-HSD	Active	L, Ed-Ep, Ed-Ctc	GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc	S, GC, L, Ed-Ep	GC, L, Ed-Ep	GC, L, Ed-Ep
	Intermediate	L, Ed-Ep, Ed-Ctc	GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc	S, GC, L, Ed-Ep	GC, L, Ed-Ep	GC, L, Ed-Ep
	Nonactive	(-)	GC, Tbl, L, Ed-Ep, Ed-Ctc	(-)	(-)	(-)
17β-HSD-1	Active	(-)	S, GC, L, Ed-Ep	S, GC, L, Ed-Ep	GC, Ed-Ep	GC, Ed-Ep
	Intermediate	GC, Ed-Ep	S, GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc	GC, Ed-Ep	S, GC, L, Ed-Ep	S, GC, L, Ed-Ep
	Nonactive	GC, Ed-Ep	S, L, Ed-Ep	(-)	(-)	S, L, Ed-Ep
17β-HSD-2	Active	S, GC, Ed-Ep, Ed-Ctc	S, Ed-Ep	S, Ed-Ep	S, Ed-Ep	S, Ed-Ep
	Intermediate	S, Ed-Ep	S, Ed-Ep	S, Ed-Ep	S, Ed-Ep	S, Ed-Ep
	Nonactive	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
17β-HSD-7	Active	GC, L, Ed-Ep	S, GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc	GC, L	L, Ed-Ep, Ed-Ctc	S, GC, L, Ed-Ep
	Intermediate	S, GC, L, Ed-Ep	S, GC, Tbl, L, Ed-Ep, Ed-Ctc	S, GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc	GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc	S, GC, L, Ed-Ep
	Nonactive	S, GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc	GC, Tbl, L, Ed-Ep, Ed-Ctc	L	S, GC, L	(-)
<b>Relaxin family</b>						
RXFP1	Active	GC, L, Ed-Ep	S, GC, L, Ed-Ep	S, GC, Ed-Ep	S, GC, L	GC, L, Ed-Ep
	Intermediate	S, GC, L, Ed-Ep	GC, L, Ed-Ep	S, GC, Ed-Ep	Ed-Ep, Ed-Ctc, BV	GC, Tbl, L, Ed-Ep, Ed-Ctc, Tc
	Nonactive	GC	S, GC, Ed-Ep, Ed-Ctc, BV	S, GC, L	(-)	Ed-Ep
Relaxin	Active	L, Ed-Ep	S, GC, L, Ed-Ep	S, L, Ed-Ep	GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc	GC, L, Ed-Ep, BV
	Intermediate	S, GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc	GC, L, Ed-Ep	S, GC, L, Ed-Ep	S, GC, Ed-Ep, Ed-Ctc	S, GC, L, Ed-Ep, BV
	Nonactive	S, GC, L, Ed-Ep, Tc	S, GC, L, Ed-Ep	L, Ed-Ep	(-)	S, GC, L, Ed-Ep, BV
RXFP2	Active	GC, L, Ed-Ep	S, GC, L, Ed-Ep	S, L, Ed-Ep	S, L, Ed-Ep	L, Ed-Ep
	Intermediate	S, GC, L, Ed-Ep	S, GC, L, Ed-Ep	S, L, Ed-Ep	S, L, Ed-Ep	S, Ed-Ep
	Nonactive	S, GC, Ed-Ep	S, GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc	S, GC, L	S, L	S, Ed-Ep
Relaxin-like factor	Active	S, GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc	S, GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc	S, GC, L, Ed-Ep	S, GC, L, Ed-Ep	L, Ed-Ep
	Intermediate	S, GC, L, Ed-Ep	S, GC, L, Ed-Ep	S, GC, L, Ed-Ep	S, GC, L, Ed-Ep, Ed-Ctc	S, Ed-Ep
	Nonactive	S, GC, L, Ed-Ep, Tc	S, GC, L, Ed-Ep	S, L, Ed-Ep	S, GC, L, Ed-Ep	S, Ed-Ep
<b>Proliferation markers</b>						
Ki67	Active	GC	GC	GC	GC	GC
	Intermediate	S, GC	S, GC	S, GC	S, GC, Ed-Ctc	GC
	Nonactive	GC	S, GC	(-)	L	(-)
Smooth muscle actin	Active	GC, Tbl, Ed-Ctc, BV, Tc	GC, Tbl, Ed-Ctc, BV, Tc	GC, Tbl, Ed-Ctc, BV, Tc	GC, Tbl, Ed-Ctc, BV, Tc	GC, Tbl, L, Ed-Ctc, BV, Tc
	Intermediate	GC, Tbl, Ed-Ctc, BV, Tc	GC, Tbl, Ed-Ctc, BV, Tc	GC, Tbl, Ed-Ctc, BV, Tc	GC, Tbl, Ed-Ctc, BV, Tc	Tbl, L, Ed-Ctc, BV, Tc
	Nonactive	Tbl, Ed-Ctc, BV, Tc	Tbl, Ed-Ctc, BV, Tc	Tbl, Ed-Ctc, BV, Tc	S, GC, Tbl, Ed-Ctc, BV, Tc	Tbl, L, BV, Tc

Abbreviations: (-), no specific staining verifiable; BV, blood vessels; Ed-Ctc, efferent duct-connective tissue cells; Ed-Ep, efferent duct-epithelium cells; GC, germ cells (spermatogonia, spermatocytes, spermatids, spermatozoa); L, Leydig cells; S, Sertoli cells; Tbl, tubular basal lamina; Tc, testicular capsule.



**Fig. 2.** Immunocytochemical analysis of testes or epididymides of various psittacine species in different reproductive activity stages. (A) Relaxin, Blue-and-Yellow Macaw, nonactive testis: cytoplasmic signal in Leydig cells, moderate lipid accumulation in the tubular centers (visualized with Sudan black B). (B) Relaxin family peptide receptor 2, Scarlet Macaw, intermediate testis: positive Sertoli and Leydig cell staining. (C) Relaxin family peptide receptor 2, Scarlet Macaw, intermediate epididymis: red staining in cytoplasm of the efferent ductal epithelium, detached lipids in the epithelial cells (visualized by Sudan black B). (D) Relaxin-like factor, Galah Cockatoo, nonactive testis: positive reaction of spermatogonia (red), interstitium with dark brown melanocytes. (E) Relaxin-like factor, Spix's Macaw, active testis: red cytoplasmic staining of spermatocytes, Sertoli, and Leydig cells. (F) Ki67, Scarlet Macaw, intermediate testis: nuclear signal in spermatocytes and Sertoli cells. (G) Ki67, Orange Winged Amazon (*Amazona amazonica*), active testis: nuclear signal in spermatogonia and spermatocytes. (H) Smooth muscle actin, Panama yellow-fronted Amazon (*Amazona ochrocephala panamensis*), intermediate epididymis: positive reaction of interductal connective tissue cells, blood vessels with Sudan black-stained erythrocytes. (I) Smooth muscle actin, budgerigar, active testis: strongly positive peritubular tissue. Bar, 50  $\mu$ m. Bv, blood vessel; Ctc, interductal connective tissue; Ed, efferent duct; Ep, epididymis; I, interstitial tissue; L, Leydig cells; Lp, lipids; M, melanocytes; S, Sertoli cells; Sc, spermatocytes; Sg, spermatogonia; Sz, spermatozoa; T, tubule.

nonactive testes of the same species consistently had no positive germ cell staining. The remarkable findings in Buds were negatively-reacting germ and interductal connective tissue cells in the nonactive stage. The nonactive AP was the only parrot with actin-positive Sertoli cells.

**4. Discussion**

A large panel of antibodies was tested for the immunocytochemical analysis of testicular tissues from eight different psittacine genera to provide repeatable techniques for the support of breeding programs in captivity. As shown in mammals, histological and immunocytochemical investigations of testicular tissue are also reliable techniques to evaluate the sexual activity of budgerigars [3]. In the following paragraphs, we will discuss our results

obtained for other psittacine species, sorted according to morphological and immunocytochemical aspects and always in comparison with our previous observations in the Bud.

**4.1. Histological criteria**

Reitemeier et al. [3] provided measurements of tubular and interstitial dimensions that define active, intermediate, and nonactive reproductive states of the Bud males. On the contrary, the other parrot species did not display significant differences within the three testicular stages. A conceivable reason for this finding might be species-specific variation in testis size based on different sperm competition, extrapair copulation behavior [44], breeding density, and clutch size [45]. We suggested that the enormous increase in testis size

of the Bud during the breeding season (influenced by higher sperm competition because of colonial breeding, extrapair copulation behavior, and clutch size [44,45]), especially in relation to the body mass, might be the reason for the significant differences in interstitial and seminiferous tubular dimensions. In contrast, testes of larger psittacines (solitarily breeders, strictly monogamous, smaller clutch size) do not enlarge that much during the breeding season, so the variation in seminiferous tubular volume and interstitial diameters might be less conspicuous. Hence, for psittacine species other than the Bud, the method of measuring tubular and interstitial dimensions is not reliable to characterize the reproductive status.

All examined large Cocs (*Cacatua alba*, *Cacatua sulphurea sulphurea*, *Eolophus roseicapilla*) presented melanocytes distributed in the testicular capsule and interstitium, a finding that is consistent with previous studies in various avian species [46–49]. Many of these reports discuss a correlation between testicular melanogenesis and gonadal regression. Marshall [47] suggested that the presence or absence of melanin was influenced by volumetric changes of the testes and the dispersion of melanocytes during the breeding season. The increased seminiferous tubules displace the melanocytes and the melanistic testis appears paler when reproductive activity begins. This matches closely with our observation that intermediate testes displayed less melanin than nonactive ones. Other authors hypothesize hormones of reproduction, such as FSH, LH, testosterone, and estrogen to have inhibitory effects on melanogenesis in the testis [46]. So it might be expected that gonads with melanin deposition show a downregulation of AR, ER $\alpha$ , and the activity of steroidogenic enzymes. However, we cannot support this view because nonactive and intermediate Cocs expressed the aforementioned hormone receptors and enzymes. Our detection of melanin accumulation in the nonactive testis of a macaw is in line with the observations of O'Malley [48]. Interestingly, melanin was not found either in testes of *Nymphicus hollandicus*, also a genus relative to Cacatuidae, or in the Buds, Amazon, or African gray parrots. Therefore, the testicular melanization seems to be species-specific, probably favored by natural selection in males of species with high mutation rates in the mitochondrial genome, as postulated by Galván et al. [50]. They also supposed that melanin protects male germ cells from oxidative stress, a fact that might be more important for large Cocs than for other parrot species.

4.2. Immunocytochemical markers: applicability, cellular distribution, and species-specificity

We were able to expand the repertory of markers for the immunocytochemical investigation of psittacine testes with the present study. This was achieved by the addition of further steroidogenic enzymes (aromatase, 17 $\beta$ -HSD-1 and -7), peptides of the RLN family (RLN, RXFP1 and 2, RLF) and the proliferation marker SMA to the spectrum established for the Bud [3]. Moreover, these markers were also tested on gonads of seven further psittacine genera to prove species-transferability of our methods. Their

**Table 4**  
Applicability of various markers for the immunocytochemical differentiation of active and nonactive gonads in male *Psittaciformes*.

Psittacine species marker	Cockatoo	African gray parrot	Macaw	Amazon parrot	Budgerigar parrot
<b>Steroid receptors</b>					
AR-1	(-)	(-)	+	(-)	+
ER- $\alpha$	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
PR	(-)	(-)	+	+	(-)
<b>Steroidogenic enzymes</b>					
Aromatase	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3 $\beta$ -HSD	+	(-)	+	+	+
17 $\beta$ -HSD-1	(-)	(-)	+	+	(-)
17 $\beta$ -HSD-2	+	+	+	+	+
17 $\beta$ -HSD-7	(-)	(-)	(-)	(-)	+
<b>Relaxin family</b>					
RXFP1	(-)	(-)	(-)	+	(-)
Relaxin	(-)	(-)	(-)	+	(-)
RXFP2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Relaxin-like factor	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<b>Proliferation markers</b>					
Ki67	+	+	+	(-)	+
Smooth muscle actin	+	+	+	(-)	+

Abbreviations: +, suitable; (-) unsuitable; AR, androgen receptor; ER, estrogen receptor; HSD, hydroxysteroid dehydrogenase; PR, progesterone receptor; RXFP, relaxin family peptide receptor.

applicability concerning the assessment of the actual reproductive stage of a parrot species is depicted in Table 4.

Data on AR expression in avian testes are particularly conflicting. Most studies in poultry and canaries report restricted receptor localization on somatic cells [51,52]. This matches with our detection of AR in Leydig cells of Buds, African gray, and Amazon parrots, in Coc Sertoli cells and macaw smooth muscle cells (testicular capsule). So far, no correlating data exist for other avian species regarding AR-positive germ cells. Therefore, the regulation of spermatogenesis is supposed to be similar to that in mammals because androgens influence testicular somatic cells rather than act directly on germ cells [51]. Thanks to the expression of AR and androgen-synthesizing enzymes (HSDs) in germ cells (Table 3), this study provides evidence about a direct influence of androgens on the germinal epithelium of parrots. The cellular-specific differences in AR-expression in the three reproductive stages indicate different sensitivity to androgens.

The coexpression of ER $\alpha$  and aromatase in the avian male tract represents a novel finding. Other authors reported the detection of both, ER $\alpha$  and aromatase, in brain regions of passerines [53]. Every conducted parrot species displayed ER $\alpha$  and aromatase in germinal epithelium coinciding with the observations of Kwon et al. [5] in White Leghorn roosters. They postulated germ cells to be sites for estrogen synthesis because of strong aromatase immunostaining.

As aforementioned for the Bud [3], this is still the first evidence of PR in gonads of male birds because so far, it has only been described in the reproductive tract of female birds, e.g., ostriches [54]. Similar to mammals, progesterone is supposed to be a stimulator of Leydig cell steroidogenesis. This could be confirmed by our results concerning

PR expression in testicular Leydig cells and fibroblast-like Leydig cell precursors [55] in epididymis.

The steroidogenic HSDs resulted as the most important group of markers for the definition of the reproductive status in male psittacines. 17 $\beta$ -HSD-2 offers an explicit differentiation between the active and nonactive stage in all examined species and 3 $\beta$ -HSD can also be used, except for in AGPs. The coexpression of 3 $\beta$ -HSD and AR (in germ, Leydig, and epididymal cells) and of 3 $\beta$ -HSD and PR (in germ cells) reflects the enzyme's function of catalyzing androstenedione and progesterone biosynthesis. This is the first report of 17 $\beta$ -HSD-2 in avian male gonads, so far known to be involved in neurosteroidogenesis of the avian brain [9]. Its expression in active and intermediate Sertoli and epididymal cells of all parrot species emphasizes its crucial role in testicular steroidogenesis. 17 $\beta$ -HSD-1 and -7 represent markers for estrogen-sensitive cells and tissues, so their presence in germ, somatic, and epididymal cells of every psittacine species underlines the remarkable effect of estrogens for the male reproductive tract. In addition, the coexistence of both, enzymes and ER $\alpha$ , in germinal epithelium and epididymis suggests a local production of estradiol.

Our results regarding the expression of RLN and its receptor RXFP1 in Sertoli and Leydig cells match closely with their cellular distribution in the mammal testis [13,14]. The existence of RXFP1-positive germ cells in boars [14] coincides with our findings, whereas the presence of RLN in psittacine germ cells seems to be a novel observation. Concerning RLF and RXFP2, a Leydig cell expression was observed that is similar to that of mammals [15]. However, the peptide and its receptor were also detected in germ, Sertoli, and epididymal cells of the parrots, a fact that is not in accordance with the mammal situation.

The fact that RLN, RLF, and their receptors are found in more different cell types of psittacine testes and epididymides in comparison with mammals can be explained as follows. Relaxin is the main product of human and rodent prostate epithelia [12], as is RLF, to a lesser extent [56]. The reproductive tract of male birds is characterized by the absence of accessory sexual glands. Lake [57] indicated that the avian intratesticular cells and epididymal epithelium function similarly to the mammal prostate. Expression of RLN, RLF, and their receptors would support Lake's statement. The function of RLN family in the avian male tract might be similar to mammals, having effects on somatic cell maturation, sperm motility, and fertilization [15].

It should be pointed out that the presence of the RLN family in avian species requires more investigation because our study, and the findings of RLN in the avian crop sac [19], ovary [58], and testes [17,18] are the only reports referring to this subject.

The expression of Ki67 in Sertoli cells of psittacines is in line with observations in the domestic fowl [20]. The fact that germ cell proliferation declines in the nonactive stage of Buds and macaws is supported by Young and Nelson [59]. They postulated the rate of cell division to decrease in the testis of birds and rodents during regression, indirectly contributing to seasonal atrophy. The coexistence of ER $\alpha$  and Ki67 in psittacine germ cells indicates estrogens to stimulate mitosis, similar to mammals. Counting of Ki67-

positive cells (see Reitemeier et al. [3]) to detect mitotic activity can be a conceivable method for all tested parrot species, except for APs. This might not only be performed for germ cells but also for Sertoli cells to determine testis size [60].

All of the conducted parrot species presented SMA-positive germ cells in testes of intermediate (except for the Bud) and active stage. These results reflect the actin expression found in elongating spermatids and spermatozoa of sexually mature and active galliform epididymides [61], although the authors did not report SMA expression in testicular germ cells. The fact that nonactive Cocs, AGPs, macaws, and Buds displayed negative germ cell staining could be applied for the definition of their reproductive activity.

The detection of SMA in interductal connective tissue cells, testicular capsule, peritubular tissue, and blood vessels of the parrots matches closely with the previous findings in other bird orders [21]. Therefore, the main function of actin in psittacine testes is supposed to be the transport of testicular fluid through the various excurrent ducts because of the contractile ability of SMA-positive cells.

Considering the results depicted in Table 3 and 4, it is obvious that the markers display different cell distribution patterns depending on the parrot species. Many reasons are conceivable for these species-specific variations in the expression of the tested markers, e.g., opportunistic species (Bud, cockatiel) breed when the conditions are most suitable, usually in arid areas after unpredictable rainfall [62]. In contrast to seasonal breeders (large Cocs, AGPs, APs, macaws), they might maintain their gonads in an advanced maturational stage so as to maximize reproductive effort in response to propitious environmental conditions. In addition, it is important to note that the birds live in different climate zones (tropical vs. subtropical species). Therefore, environmental factors, such as photostimulation, temperature, and humidity might also affect sexual activity, endocrine control, and subsequently, testicular function [63]. We also suppose that colonial versus territorial breeding has an influence on testicular cycles and endocrine control. Budgerigars are the only examined species considered as colonial breeders. In colonial breeders, the competition for nesting sites is more intense within the species which might result in differing levels of steroid hormones in opposition to territorial breeders. Tropical birds (like Cocs, macaws, or APs) often hold permanent feeding territories that cannot be defended by a single bird and apparent pair bonds might arise from the attachment to this territory [64]. This pair bonding plays a crucial role in dominance behavior which is, amongst other factors, influenced by androgens [65]. Therefore, the mating system can be considered as another important manipulating factor. As an example, cockatiels sometimes show extrapair copulation behavior [49] in comparison with perennial monogamy (which means year-round pair bonding, not only during breeding season and parental care) in Cocs [64] or long-term pair bonds in Amazons [66]. Extrapair copulation is accompanied by changes in dominance and mating behavior, probably resulting in different sensitivity of testicular cells to hormones or other factors. Additionally,

pair mating depends on migration behavior, so variations might appear between sedentary [67] and irregular migrating birds [68]. In sedentary birds, mated pairs function as social alliances in resource competition. Most of all, especially with regard to RLN [12], evolutionary aspects might influence the species-specific cellular expression of the RLN family peptides and receptors. Within the scope of divergency of parrots, we hypothesize the development of different expression patterns.

#### 4.3. Conclusions

In conclusion, we were able to detect 14 of the 15 tested markers in the testes of all investigated parrot species, even though they displayed partly heterogeneous, species-specific expression patterns. In general, 17 $\beta$ -HSD-2, 3 $\beta$ -HSD, and SMA allowed a precise definition of reproductive activity, whereas the other steroidogenic enzymes, steroid receptors, RLN peptides, and Ki67 turned out to be applicable depending on the species. The immunocytochemical methods established within the framework of our previous study in the Bud [3], were successfully adapted to other psittacines. It is important to note that different cellular distribution patterns do not allow a transfer of the results from one parrot species to another. Therefore, we recommend using a combination of markers, always in consideration of the investigated species. Our study delivers a reliable repertoire of sexual markers, an essential basis for further analyses, for instance, the peripheral detection of these factors in psittacine blood or feces.

#### Acknowledgments

The authors thank Dr. Thomas Scholzen (Research Centre Borstel) for his generous gift of the Ki67 antibody.

This study was supported by the European Union (European Social Fund; ESF) and the German Research Foundation (DFG), DFG EI 333/12-2.

The European Social Fund (ESF) is a structural fund set up by the European Union. It was established in 1957 in an effort to scale down the differences in living standards between people living in the various regions of the European Union. Saxony also benefits from this structural fund. The benefits are felt in particular by businesses that are creating more permanent jobs, by unemployed individuals seeking to achieve commercial autonomy, and by qualified specialists who wish to initiate well-grounded research projects.

The DFG is the self-governing organization for science and research in Germany. It serves all branches of science and the humanities. In organizational terms, the DFG is an association under private law. Its membership consists of German research universities, nonuniversity research institutions, scientific associations, and the Academies of Science and the Humanities. The DFG receives the large majority of its funds from the states and the Federal Government, which are represented in all Grants Committees. At the same time, the voting system and procedural regulations guarantee science-driven decisions.

The role of ESF and DFG is confined to financial support of this study; both funding sources were neither involved

in study design, nor in the collection, analysis, and interpretation of data, in the writing of the report, and in the decision to submit the report for publication.

#### References

- [1] IUCN Red List of Threatened Species, Version 2012.2, <<http://www.iucnredlist.org/>>; 2013.
- [2] BirdLife International. BirdLife checklist of the birds of the world, with conservation status and taxonomic sources, <<http://www.birdlife.org/datazone/species/search>>; 2013.
- [3] Reitemeier S, Hänse M, Hahn A, Schmidt V, Steinbach-Sobiraj K, Krautwald-Junghans ME, et al. Evaluating the reproductive status of the male budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). *Gen Comp Endocrinol* 2011;171:350–8.
- [4] Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:35–40.
- [5] Kwon S, Hess RA, Bunick D, Nitta H, Janulis L, Osawa Y, et al. Rooster testicular germ cells and epididymal sperm contain P450 aromatase. *Biol Reprod* 1995;53:1259–64.
- [6] Lemazurier E, Séralini GE. Evidence for sulfatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activities in equine epididymis and uterus. *Theriogenology* 2002;58:113–21.
- [7] Pelletier G, Luu-The V, Li S, Ren L, Labrie F. Localization of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 mRNA in mouse tissues. *J Mol Endocrinol* 2004;33:459–65.
- [8] Penning TM. Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr Rev* 1997;18:281–305.
- [9] Matsunaga M, Ukena K, Tsutsui K. Androgen biosynthesis in the quail brain. *Brain Res* 2002;948:180–5.
- [10] Ritters LV, Baillien M, Eens M, Pinxten R, Foidart A, Ball GF, et al. Seasonal variation in androgen-metabolizing enzymes in the diencephalon and telencephalon of the male European starling (*Sturnus vulgaris*). *J Neuroendocrinol* 2001;13:985–97.
- [11] Wajima Y, Furusawa T, Kawachi S, Wakabayashi N, Najabayashi O, Nishimori K, et al. The cDNA cloning and transient expression of an ovary-specific 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase of chickens. *Gene* 1999;233:75–82.
- [12] Ivell R, Kotula-Balak M, Glynn D, Heng K, Anand-Ivell R. Relaxin family peptides in the male reproductive system - a critical appraisal. *Mol Hum Reprod* 2011;17:71–84.
- [13] Cardoso LC, Nascimento AR, Royer C, Porto CS, Lazari MFM. Locally produced relaxin may affect testis and vas deferens function in rats. *Reproduction* 2010;139:185–96.
- [14] Kohsaka T, Kato S, Qin S, Minagawa I, Yogo K, Kawarasaki T, et al. Identification of boar testis as a source and target tissue of relaxin. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1160:194–6.
- [15] Agoulnik AI. Relaxin and related peptides in male reproduction. *Adv Exp Med Biol* 2007;612:49–64.
- [16] Hisaw FL, Zarrow MX. The physiology of relaxin. *Vitam Horm* 1950;8:151–78.
- [17] Steinetz BG, Beach VL, Kroc RL. The physiology of relaxin in laboratory animals. In: Lloyd CH, editor. *Recent progress in the endocrinology of reproduction*. New York: Academic Press; 1959. p. 389–427.
- [18] Steinetz BG, Beach VL, Tripp LV, Defalco RJ. Reactions of antisera to porcine relaxin with relaxin-containing tissues of other species in vivo and in vitro. *Acta Endocrinol* 1964;47:371–84.
- [19] Bani G, Sacchi TB, Bigazzi M. Response of the pigeon crop sac to mammatrophic hormones: comparison between relaxin and prolactin. *Gen Comp Endocrinol* 1990;80:16–23.
- [20] Bozkurt HH, Aktaş A, Ulkay MB, Firat UB. Sertoli cell proliferation during the post hatching period in domestic fowl. *J Vet Sci* 2007;8:219–22.
- [21] Aire TA, Ozegebe PC. The testicular capsule and peritubular tissue of birds: morphometry, histology, ultrastructure and immunohistochemistry. *J Anat* 2007;210:731–40.
- [22] Maretta M, Maretová E. Immunohistochemical demonstration of myoid cells in the testis and its excurrent ducts in the domestic fowl. *Br Poult Sci* 2004;45:585–9.
- [23] Van Nassauw L, Harrisson F, Callebaut M. Smooth muscle cells in the peritubular tissue of the quail testis. *Eur J Morphol* 1993;31:60–4.
- [24] Romeis B. *Paraplasmatische Substanzen - Färbung mit Sudan und Scharlach*. In: Böck P, editor. *Mikroskopische technick*, auflage 17. München, Wien, Baltimore: Urban and Schwarzenberg; 1989. p. 379–82.

- [25] Clancy AN, Whitman C, Michael AP, Albers HE. Distribution of androgen receptor-like immunoreactivity in the brains of intact and castrated male hamsters. *Brain Res Bull* 1994;33:325–32.
- [26] Takeda H, Nakamoto T, Kokontis J, Chodak GW, Chang C. Autor-regulation of androgen receptor expression in rodent prostate: immunohistochemical and *in situ* hybridization analysis. *Biochem Biophys Res Comm* 1991;177:488–96.
- [27] Bläuer M, Vaalasti A, Pauli SL, Ylikomi T, Joensuu T, Tuohimaa P. Location of androgen receptor in human skin. *J Invest Dermatol* 1991;97:264–8.
- [28] Nevalainen MT, Valve EM, Mäkelä SI, Bläuer M, Tuohimaa PJ, Härkönen PL. Estrogen and prolactin regulation of rat dorsal and lateral prostate in organ culture. *Endocrinology* 1991;129:612–22.
- [29] Simon C, Einspanier A. The hormonal induction of cervical remodeling in the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Reproduction* 2009;137:517–25.
- [30] Miller K, Auld J, Jessup E, Rhodes A, Ashton-Key M. Antigen unmasking in formalin-fixed routinely processed paraffin wax-embedded sections by pressure cooking: a comparison with a microwave oven heating and traditional methods. *Adv Anat Pathol* 1995;2:60–4.
- [31] Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991;39:741–8.
- [32] Einspanier A, Lieder K, Brüns A, Husen B, Thole H, Simon C. Induction of endometriosis in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Mol Hum Reprod* 2006;12:291–9.
- [33] Beindorff N, Einspanier A. Luteotrophic effects of relaxin, chorionic gonadotrophin and FSH in common marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*). *Reproduction* 2010;139:923–30.
- [34] Purohit VD, Basrur PK, Bhatnagar MK. Histochemical localization of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the testes of chicken-pheasant hybrids. *Histochem J* 1977;9:293–9.
- [35] Tsutsui K, Matsunaga M, Miyabara H, Ukena K. Neurosteroid biosynthesis in the quail brain: a review. *J Exp Zool Part A Comp Exp Biol* 2006;305:733–42.
- [36] Einspanier A, Lieder K, Husen B, Ebert K, Lier S, Einspanier R, et al. Relaxin supports implantation and early pregnancy in the marmoset monkey. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1160:140–6.
- [37] Husen B, Adamski J, Brüns A, Deluca D, Fuhrmann K, Möller G, et al. Characterization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7 in reproductive tissues of the marmoset monkey. *Biol Reprod* 2003;68:2092–9.
- [38] Anand-Ivell RJ, Relan V, Balvers M, Coiffec-Dorval I, Fritsch M, Bathgate RA, et al. Expression of the insulin-like peptide 3 (INSL3) hormone-receptor (LGR8) system in the testis. *Biol Reprod* 2006;74:945–53.
- [39] Ivell R, Bathgate RA. Reproductive biology of the relaxin-like factor (RLF/INSL3). *Biol Reprod* 2002;67:699–705.
- [40] Scholzen T, Endl E, Wohlenberg C, van der Sar S, Cowell IG, Gerdes J, et al. The Ki-67 protein interacts with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure. *J Pathol* 2002;196:135–44.
- [41] Traut W, Endl E, Scholzen T, Gerdes J, Winking H. The temporal and spatial distribution of the proliferation associated Ki-67 protein during female and male meiosis. *Chromosoma* 2002;111:156–64.
- [42] Brennan PA, Umar T, Zaki GA, Langdon JD, Spedding A, Buckley J, et al. Are myoepithelial cells responsible for the widespread expression of inducible nitric oxide synthase in pleomorphic adenoma? An immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med* 2000;29:279–83.
- [43] Roholl PJ, Elbers HR, Prinsen I, Claessens JA, van Unnik JA. Distribution of actin isoforms in sarcomas: an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1990;21:1269–74.
- [44] Garamszegi LZ, Eens M, Hurtrez-Boussès S, Möller AP. Testosterone, testes size, and mating success in birds: a comparative study. *Horm Behav* 2005;47:389–409.
- [45] Pitcher TE, Dunn PO, Whittingham LA. Sperm competition and the evolution of testes size in birds. *J Evol Biol* 2005;18:557–67.
- [46] Anthony RG, Buss IO. Relationship of gonadal recrudescence and testicular melanogenesis in California quail. *Condor* 1974;76:452–7.
- [47] Marshall AJ. Breeding seasons and migration. In: Marshall AJ, editor. *Biology and comparative physiology of birds*. New York: Academic Press; 1961. p. 307–39.
- [48] O'Malley B. Avian anatomy and physiology. In: O'Malley B, editor. *Clinical anatomy and physiology of exotic species. Structure and function of mammals, birds, reptiles and amphibians*. Edinburgh, London: Elsevier Saunders; 2005. p. 97–161.
- [49] Spoon TR, Millam JR, Owings DH. Behavioural compatibility, extrapair copulation and mate switching in a socially monogamous parrot. *Anim Behav* 2007;73:815–24.
- [50] Galván I, Møller AP, Erritzøe J. Testicular melanization has evolved in birds with high mtDNA mutation rates. *J Evol Biol* 2011;24:988–98.
- [51] Dornas RA, Oliveira AG, Dias MO, Mahecha GA, Oliveira CA. Comparative expression of androgen receptor in the testis and epididymal region of roosters (*Gallus domesticus*) and drakes (*Anas platyrhynchos*). *Gen Comp Endocrinol* 2008;155:773–9.
- [52] Nastiuk KL, Clayton DF. Seasonal and tissue specific regulation of canary androgen receptor messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 1994;134:640–9.
- [53] Canoine V, Fusani L, Schlinger B, Hau M. Low sex steroids, high steroid receptors: increasing the sensitivity of the nonreproductive brain. *Dev Neurobiol* 2007;67:57–67.
- [54] Madekurozwa MC. A study of the immunohistochemical localization of the progesterone, oestrogen receptors in the magnum of the immature ostrich, *Struthio camelus*. *Anat Histol Embryol* 2002;31:317–20.
- [55] Madekurozwa MC, Chapvepi TS, Matema S, Teerds KJ. Relationship between seasonal changes in spermatogenesis in the juvenile ostrich (*Struthio camelus*) and the presence of the LH receptor and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Reproduction* 2002;123:735–42.
- [56] Klonisch T, Müller-Huesmann H, Riedel M, Kehlen A, Bialek J, Radestock Y, et al. INSL3 in the benign hyperplastic and neoplastic human prostate gland. *Int J Onc* 2005;27:307–15.
- [57] Lake PE. Fowl semen as collected by the massage method. *J Agric Sci* 1957;49:120–6.
- [58] Brackett KH, Fields PA, Dubois W, Chang SM, Mather FB, Fields MJ. Relaxin: an ovarian hormone in an avian species (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol* 1997;105:155–63.
- [59] Young KA, Nelson RJ. Mediation of seasonal testicular regression by apoptosis. *Reproduction* 2001;122:677–85.
- [60] Orth JM. The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in the testes of fetal rats. *Endocrinology* 1984;115:1248–55.
- [61] Aire TA, Ozege PC. Immunohistochemistry of the cytoskeleton of testis in birds of the Galloanserae monophyly. *Cell Tissue Res* 2008;333:311–21.
- [62] Forshaw JM. *Australian parrots*. Sydney: Landsdowne Editions; 1981.
- [63] Dawson A, Sharp PJ. Photorefractoriness in birds – photoperiodic and non-photoperiodic control. *Gen Comp Endocrinol* 2007;153:378–84.
- [64] Oring LW. Avian mating systems. In: Farner J, King J, editors. *Avian Biology*, Volume 6. New York: Academic Press; 1982. p. 1–92.
- [65] Ardia DR, Broughton DR, Gleicher MJ. Short-term exposure to testosterone propionate leads to rapid bill color and dominance changes in zebra finches. *Horm Behav* 2010;58:526–32.
- [66] Rodriguez Castillo AM, Eberhard JR. Reproductive behavior of the Yellow-crowned Parrot (*Amazona ochrocephala*) in Western Panama. *Wilson J Ornithol* 2006;118:225–36.
- [67] Pepper JW. The behavioral ecology of the glossy black-cockatoo *Calyptorhynchus lathami halmaturinus*. PhD thesis. Biology Department, The University of Michigan; 1996.
- [68] Myers SA, Millam JR, El Halawani ME. Plasma LH and prolactin levels during the reproductive cycle of the cockatiel (*Nymphicus hollandicus*). *Gen Comp Endocrinol* 1989;73:85–91.

---

## 4 DISKUSSION

Wildlebende Papageienpopulationen sind mit steigender Tendenz vom Aussterben bedroht. Um dem entgegenzuwirken, wurden zahlreiche Artenschutzprogramme im natürlichen Verbreitungsgebiet der Vögel ins Leben gerufen. Zusätzlich existieren intensive Bemühungen, gefährdete Spezies in Menschenobhut zu reproduzieren und zu erhalten. In der Praxis gestaltet sich dies aufgrund von Zwangsverpaarungen und eingeschränkter genetischer Vielfalt allerdings schwierig. Des Weiteren wird der Erfolg solcher Zuchtprogramme durch das begrenzte Wissen um physiologische und pathologische Vorgänge im Reproduktionstrakt von Papageienvögeln erschwert.

Vor diesem Hintergrund beschäftigte sich die vorliegende Arbeit mit der histologischen und immunzytochemischen Untersuchung fixierter Gonaden männlicher *Psittaciformes*. Die Etablierung reproduktionsrelevanter Marker sollte eine Aussage zum Fortpflanzungsstatus ermöglichen und einen tieferen Einblick in die lokale Hormonproduktion im Hoden geben. Hierzu wurde ein umfangreiches Repertoire immunzytochemischer Marker (u. a. Steroidrezeptoren, steroidale Enzyme und Relaxinpeptide), die auch beim Säugetier Anwendung finden, an fixierten männlichen Reproduktionsorganen getestet. Die Ergebnisse wurden in zwei Fachartikeln publiziert (REITEMEIER et al. 2011, REITEMEIER et al. 2013).

Folgende zentrale Aussagen ergeben sich aus der vorliegenden Arbeit:

1. Für den Wellensittich konnten histologische Kriterien zur Beurteilung des Reproduktionsstatus erarbeitet werden.
2. Am Modelltier Wellensittich konnten immunzytochemische Marker zur Beurteilung des Reproduktionsstatus etabliert werden.
3. Die etablierten Methoden sind übertragbar auf andere Papageienspezies.
4. Die mittels immunzytochemischer Analysen am Modelltier Wellensittich erzielten Ergebnisse sind nur eingeschränkt auf andere Papageienspezies übertragbar.
5. Es existieren spezies-spezifische Unterschiede in der zellulären Lokalisation der Marker im Hodengewebe.
6. Für alle untersuchten Papageienspezies konnten geeignete Marker zur Beurteilung des Reproduktionsstatus selektiert werden.

Im Folgenden sollen die Methodik und die erzielten Resultate eingehend diskutiert werden.

### **Methodenkritische Aspekte**

Alle analysierten Hodenproben stammten aus pathologischem Untersuchungsgut. Hierbei wurden nur solche Vögel in die Studie mit einbezogen, deren Gonaden aus histologischer Sicht keine krankhaften Befunde aufwiesen. Das Sektionsmaterial im klinischen Alltag beinhaltet Papageien, die in Menschenobhut gehalten worden sind. Die dabei verwendeten Licht-, Temperatur- und Fütterungsregime spiegeln nur bedingt die Situation im natürlichen Verbreitungsgebiet der jeweiligen Arten wider. Es ist aber davon auszugehen, dass die Hodenfunktion und deren hormonelle Steuerung aufgrund genetisch vorprogrammierter, endogener Rhythmen weitgehend unabhängig von den Haltungsbedingungen sind (GWINNER 1989). Zudem ist angesichts des aktuellen Gefährdungsstatus der Papageienvögel weltweit eine Probenentnahme bei wildlebenden Vertretern dieser Vogelordnung nicht zu rechtfertigen.

Insgesamt wurde Hodengewebe von 45 Wellensittichen, 12 Kakadus, 7 Amazonen, 7 Kongo-Graupapageien und 6 Aras histologisch und immunzytochemisch untersucht. Trotz des geringen Probenumfangs bei den Großpapageien sind die erzielten Resultate als repräsentativ anzusehen, da alle der am Wellensittich etablierten Marker bei diesen Gattungen gleichermaßen sichtbar gemacht werden konnten.

### **Morphologische Kriterien zur Einstufung der Reproduktionsaktivität**

Bei den Wellensittichen wurde die Makroskopie der Hoden mit den Ergebnissen der Histologie verglichen. Hier konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der makroskopischen Beurteilung der Hoden aktive und inaktive Reproduktionsstadien eindeutiger identifizierbar waren als intermediäre Formen. HÄNSE et al. (2008) hingegen weisen auf die Problematik der endoskopischen Inspektion inaktiver Hoden hin. Die Autoren beobachten histologisch oftmals ein weiter fortgeschrittenes Stadium der Spermatogenese im Gegensatz zum makroskopischen Erscheinungsbild. Diese Abweichungen resultieren vermutlich aus der Verwendung unterschiedlicher diagnostischer Methoden.

Während der sexuellen Aktivität der Wellensittiche wurden signifikante Zunahmen von Hodengröße und -gewicht beobachtet, was bisherige Untersuchungen bei Nutzgeflügel (KIM und YANG 2001), kleinen Papageienvögeln (GARTRELL 2002, POHL-APEL et al. 1982, SAMOUR 2002) sowie zahlreichen anderen Vogelordnungen (GARAMSZEGLI et al. 2005) bestätigt.

Die an der Modellspezies erhobenen Messungen von Interstitium und Tubulusdurchmesser (Abbildung 1 und 2, Publikation 1) decken sich mit den Ergebnissen anderer Studien (GARTRELL 2002, HUMPHREYS 1975, KIRBY und FROMAN 2000). Diese beschreiben ebenfalls, dass sich die Samenkanälchen mit steigender Reproduktionsaktivität ausdehnen,

während das Interstitium schmaler wird. Auch bei den anderen Papageienspezies konnte dies beobachtet werden, jedoch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stadien (Tabelle 2, Publikation 2). Ein möglicher Grund hierfür können spezies-spezifische Variationen in der Hodengröße sein, die auf Unterschieden in Spermienkonkurrenz, Kopulationsverhalten, Brutdichte und Gelegegröße basieren (GARAMSZEGI et al. 2005, PITCHER et al. 2005). Während der Brutphase der Wellensittiche tritt eine enorme Größenzunahme der Hoden im Verhältnis zur Körpermasse auf. Diese wird durch höhere Spermienkonkurrenz infolge Koloniebrütens, Polygamie und großer Gelege verursacht. Dagegen vergrößern sich die Gonaden von Großpapageien (Einzelbrüter, streng monogam, kleinere Gelegegröße) während der Brutphase nicht in diesem Ausmaß. Daher variieren Tubulusdurchmesser und interstitielle Breite zwischen den drei Reproduktionsstadien weniger und im Gegensatz zur Modellspezies auch nicht signifikant. Demzufolge kann die Methode der Messung von Samenkanälchen und Interstitium lediglich beim Wellensittich als Kriterium für die Definition eines aktiven, intermediären und inaktiven Reproduktionsstadiums herangezogen werden.

Das Vorhandensein, die Morphologie und die Teilungsaktivität der Keimzellstadien lieferte bei allen untersuchten Papageienvögeln die Grundlage für die Einteilung in drei testikuläre Aktivitätsphasen. Obwohl je nach Papageienspezies unterschiedliche Einteilungen des Hodenzyklus vorliegen (GARTRELL 2002, MAITRA und DEY 1992, POHL-APEL et al. 1982, SAMOUR et al. 1987, SMITH und BRERETON 1976), basieren letztlich alle auf den vorgenannten Kriterien. Die in der Arbeit vorgenommene Gliederung in aktive, intermediäre und inaktive Reproduktionsphase entspricht derjenigen bei Vögeln mit ausgeprägten Brutzyklen. Hier werden Akzeleration, Kulmination und Regeneration unterschieden (LOFTS und MURTON 1973, SAMOUR 2002). Erstaunlich ist, dass auch Wellen- und Nymphensittiche diese drei testikulären Phasen aufweisen, obwohl sie zu den opportunistischen Brutvögeln gehören. Sie sind asaisonal und erheblich von wechselnden Umwelteinflüssen abhängig (POHL-APEL et al. 1982). Dennoch weisen auch sie endogene zirkannuale Rhythmen auf, die von äußeren Faktoren wie beispielsweise Niederschlagsmenge synchronisiert werden (GWINNER 1989, POHL-APEL 1980). Diese genetisch vorprogrammierten Rhythmen erklären die Übereinstimmung mit saisonalen Vögeln bezüglich der Stadieneinteilung.

Die vorliegende Studie weist erstmalig Ki67 in aviären Hoden nach. Die Zählung der Ki67-positiven Zellen kann bei den untersuchten Papageien zur Ermittlung der mitotischen Aktivität von Keim- und Sertoli-Zellen herangezogen werden. Das Ausmaß der Keimzellteilung ist für die Einschätzung der Gonadenaktivität von Bedeutung. Die in der inaktiven Phase abnehmende mitotische Aktivität wurde bereits bei anderen Vogelarten und

Nagetieren während der Hodenregression beobachtet (YOUNG und NELSON 2001). Die Expression des Ki67 in den Sertoli-Zellen der Papageien deckt sich mit dem Nachweis von Proliferationsvorgängen in Hoden von Tauben mittels BrdU(5-bromo-2-deoxyuridin)-Färbung (BOZKURT et al. 2007). Die Zählung der sich teilenden Sertoli-Zellen dient der Untersuchung der Hodengröße (ORTH 1984).

Die Lipidansammlungen im Inneren der Samenkanälchen inaktiver und intermediärer Wellensittiche stellen überwiegend Lipofuszin dar (Abbildung 3g-h, Publikation 1). Sie wurden bereits in den 1970er Jahren als cholesterol-positives, lipidähnliches Material im Zytoplasma von Sertolizellen während des Stadiums der Regeneration (LOFTS und MURTON 1973) sowie der Akzeleration (HUMPHREYS 1975) beschrieben. Der Lipidanteil des Lipofuszins enthält unter anderem auch Cholesterol (BRUNK und TERMAN 2002). Dies könnte darauf hinweisen, dass das Pigment während des Stadiums der sexuellen Ruhe als Cholesterolspeicher fungiert. Mit Beginn der aktiven Phase wird dann das Vorläufermolekül der Steroidbiosynthese wieder mobilisiert. Vorangegangene Untersuchungen bei Nutzgeflügel (AIRE 2002a, AIRE 2002b), aber auch bei Säugetieren (ORSI et al. 1990) und Amphibien (SASSO-CERRI et al. 2004) belegen ebenfalls den Zusammenhang zwischen dem Lipidgehalt im Hoden und der Steroidogenese. Zudem wurde beim Nutzgeflügel (AIRE 2002a, AIRE 2002b, TINGARI 1973) und auch bei den hier untersuchten Papageienvögeln (REITEMEIER et al. 2011, REITEMEIER et al. 2013) gezeigt, dass inaktive Gonaden weder 3 $\beta$ - noch 17 $\beta$ -HSD-Tätigkeit besitzen, um Steroide herzustellen.

Die Melanineinlagerungen, die in erster Linie bei den großen Kakadus in Hodenkapsel und Interstitium auftraten (Abbildung 1a und b, Publikation 2), können offenbar nicht zur Unterscheidung des Reproduktionsstatus herangezogen werden. Zwar fanden sich die Pigmentansammlungen vornehmlich bei inaktiven und intermediären Gonaden, was Publikationen entspricht, die einen Zusammenhang zwischen testikulärer Melanogenese und Hodenregression beschreiben (ANTHONY und BUSS 1974, MARSHALL 1961). Dennoch ist die Melaninspeicherung im Hoden ein spezies-spezifisches Phänomen. Durch natürliche Selektion wird es vor allem bei Männchen von Arten mit hohen Mutationsraten im mitochondrialen Genom begünstigt. Die Funktion des Melanins als Schutz für männliche Keimzellen gegenüber oxidativem Stress wird diskutiert (GALVÁN et al. 2011).

Zusammenfassend ist die rein makroskopische Beurteilung der Hodenmorphologie für die Charakterisierung des Reproduktionsstatus unzureichend, weil diese Methode ungenaue Resultate liefert (GARTRELL 2002, HÄNSE et al. 2008). Zusätzliche histologische Untersuchungen (inklusive Messungen von Tubuli und Interstitium, Sichtbarmachung von Lipiden im Samenkanälchen, Ermittlung der mitotischen Aktivität von Keim- und Sertoli-Zellen) können die Informationen zur Hodenaktivität präzisieren. Um eindeutige Erkenntnisse

zu funktionellen Aspekten im Hoden, beispielsweise hinsichtlich der endokrinen Steuerung der Gonaden, zu gewinnen, ist es unerlässlich, immunzytochemische Untersuchungen zur Beurteilung mit heranzuziehen.

### **Etablierte immunzytochemische Marker**

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 14 Marker für die immunzytochemische Untersuchung der Gonaden männlicher Wellensittiche erarbeitet. Es handelt sich um den erstmaligen Nachweis dieser gegen Steroidrezeptoren, steroidale Enzyme, Relaxinpeptide und proliferierende Zellproteine gerichteten Antikörper im Hodengewebe von Papageienvögeln. Demnach können die erzielten Resultate lediglich unter Berücksichtigung vergleichbarer Publikationen bei Säugetieren und anderen Vogelordnungen diskutiert werden. Die entscheidenden Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu den vorgenannten Tierklassen sind im Folgenden dargestellt.

Während das Auftreten des AR in den *Ductuli efferentes* mit bisherigen Erkenntnissen beim Nutzgeflügel (DORNAS et al. 2008, SHANBHAG und SHARP 1996) korrespondiert, existieren bisher noch keine Erkenntnisse über AR-positive Keimzellen in Vogelhodens. Man vermutet daher, dass die Steuerung der Spermatogenese ähnlich zu der bei Säugetieren verläuft. Dort beeinflussen Androgene eher die somatischen Zellen des Hodens als direkt an den Keimzellen zu wirken (DORNAS et al. 2008). Der Nachweis von AR und 3 $\beta$ -HSD in den Spermatozyten der untersuchten Wellensittiche liefert jedoch Hinweise auf einen unmittelbaren Einfluss der Androgene auf das Keimepithel von Vögeln. Je nach Reproduktionszustand scheint eine variable Sensitivität gegenüber Androgenen vorhanden zu sein, da der AR unterschiedliche Zellverteilungsmuster aufweist.

Auch der Nachweis von ER $\alpha$  in testikulären Zellen (Keim- und Leydig-Zellen) ist beim Vogel zuvor nicht erfolgt, deckt sich aber mit bisherigen Erkenntnissen bei verschiedenen Säugetierarten (KÖHLER et al. 2007, KONRAD et al. 1998). Lediglich ER $\beta$ , der im Uterus von Säugetieren die Wirkungen von ER $\alpha$  moduliert (WEIHUA et al. 2000), wurde in Keimzellen und somatischen Zellen von Hähnen exprimiert (OLIVEIRA et al. 2011). Die Autoren sehen einen Zusammenhang zwischen östrogenen Wirkung und spermatogener Zellproliferation. Die bei den Papageienvögeln festgestellte Koexistenz von ER $\alpha$  und Ki67 in den Keimzellen unterstützt diese Aussage. Offenbar stimulieren Östrogene, ähnlich wie beim Säuger, die Mitose (WAGNER et al. 2006). Zudem zeigt die vorliegende Arbeit erstmalig das gleichzeitige Vorkommen von ER $\alpha$  und Aromatase im Keimepithel männlicher Vögel. Eine Koexpression von Rezeptor und steroidogenem Enzym wurde bisher nur im Gehirn von Sperlingsvögeln beobachtet (CANOINE et al. 2007). Samenzellen sind demnach Ort der Östrogensynthese, wie bereits von KWON et al. (1995) postuliert. Der zusätzliche Nachweis

von ER $\alpha$  und Aromatase im Nebenhoden deutet darauf hin, dass dieser nicht nur auf androgene, sondern auch auf östrogene Einflüsse reagiert. Funktionen des Nebenhodens wie z. B. Proteinexpression, Reabsorption von Flüssigkeiten, Spermienkonzentration und -reifung (BAHR et al. 2006, ESPONDA und BEDFORD 1985) werden also auch von Östrogenen gesteuert.

Frühere Untersuchungen dokumentieren eine PR-Expression im Gehirn von Tauben und im weiblichen Geschlechtstrakt von Nutzgeflügel (GONZALEZ-MORAN et al. 2013, LEA et al. 2001, MADEKUROZWA 2002a, MADEKUROZWA 2002b). Deshalb stellt der Nachweis des Rezeptors im aviären Hoden eine neue Erkenntnis dar. Die zelluläre Verteilung von PR deckt sich mit der bei Säugetieren (KÖHLER et al. 2007, WEBER et al. 2002). Dies lässt den Schluss zu, dass Progesteron auch beim Vogel die Spermatogenese und die Steroidbiosynthese beeinflusst (EL-HEFNAWY und HUHTANIEMI 1998, ROSSATO et al. 1999).

3 $\beta$ -HSD wurde in Spermatozyten und Leydig-Zellen aktiver und intermediärer Reproduktionsstadien sichtbar gemacht. Dies stimmt mit Untersuchungen an Hähnen und Straußenvögeln überein (MADEKUROZWA et al. 2002, PUROHIT et al. 1977). Jedoch exprimierten die Strauße dieses steroidale Enzym während sämtlicher Phasen des Hodenzyklus, was auf spezie-spezifische Unterschiede in der Enzymausstattung schließen lässt. Die Koexpression von 3 $\beta$ -HSD mit AR (in Keim- und Leydig-Zellen sowie Nebenhoden-Epithel) und mit PR (in Keimzellen) erklärt seine katalytische Funktion in der Androstendion- und Progesteronsynthese.

17 $\beta$ -HSD-2, das im aviären Gehirn in die Neurosteroidbiosynthese involviert ist (MATSUNAGA et al. 2002), wurde in Sertoli-Zellen nachgewiesen (Abbildungen 4i bis j, Publikation 1 und Abbildungen 1G-I, Publikation 2). Wie bereits von anderen Autoren vermutet (LAKE 1981, MICHEL 1993, OROSZ 1997), scheinen diese somatischen Zellen in den Samenkanälchen zur Hormonproduktion fähig zu sein. Zusätzlich zeigt das Vorkommen dieses steroidal Enzyms in den Zellen zwischen den Nebenhodengängen, dass diese in die Androgenbiosynthese eingeschaltet sind. Dies bestätigt Beobachtungen von MADEKUROZWA et al. (2002), die solche Zellen als fibroblastenähnliche Leydig-Vorläufer ansehen.

Die vorliegende Arbeit liefert bislang den ersten immunzytochemischen Nachweis der Relaxinpeptide und ihrer Rezeptoren im Hoden und Nebenhoden von Vögeln (Abbildungen 1M-O und 2A-E, Publikation 2). Teilweise deckt sich ihre zelluläre Lokalisation mit den Untersuchungen beim Säugetier, z. B. RLF und RXFP2 in Leydig-Zellen (AGOULNIK 2007). Jedoch waren die Vertreter der Relaxinpeptid-Familie bei den Papageien in weitaus mehr Zelltypen von Hoden und Nebenhoden anzutreffen. Möglicher Grund dafür ist die Tatsache,

dass Vögel keine akzessorischen Geschlechtsdrüsen besitzen. Es wird daher vermutet, dass intratestikuläre und epididymale Zellen die Funktion der nicht vorhandenen Prostata übernehmen (LAKE 1957). Mit dieser Annahme korrespondiert, dass beim Säugetier hauptsächlich RLN, zu einem geringeren Teil auch RLF Produkte des Prostataepithels sind (IVELL et al. 2011, KLONISCH et al. 2005). Ähnlich zu den Gegebenheiten bei den Mammalia scheint die Relaxinpeptid-Familie im aviären männlichen Geschlechtstrakt die Reifung somatischer Zellen, die Spermienmotilität sowie die Befruchtung zu beeinflussen (AGOULNIK 2007). Aufgrund der wenigen Einzelnachweise beim Vogel (BANI et al. 1990, BRACKETT et al. 1997, REITEMEIER et al. 2013, STEINETZ et al. 1959, STEINETZ et al. 1964) sind bezüglich dieser Peptidhormone weitergehende Untersuchungen in der Klasse Aves notwendig.

Das Mikrofilament SMA ist bereits bei anderen Vogelordnungen für seine Beteiligung an Transportprozessen in Hoden und Nebenhoden bekannt (AIRE und OZEGBE 2007, MARETTA und MARETTOVÁ 2004, OZEGBE et al. 2012). Diese Funktion konnte ebenso für Papageienvögel bestätigt werden. Außerdem wurde Aktin im Keimepithel nachgewiesen, was sich mit Beobachtungen bei Säugetieren deckt (AUMULLER und SEITZ 1988, IM et al. 2012, OKO et al. 1991). AIRE und OZEGBE (2008) beschrieben das Mikrofilament bei sexuell aktiven Hühnervögeln nur in solchen elongierten Spermatischen und Spermatozoen, die sich bereits in den Nebenhodengängen befanden. Die funktionelle Bedeutung von Aktin in Keimzellen ist dabei noch weitgehend ungeklärt, jedoch scheint es ähnlich zum Säuger eine Rolle bei der Spermienreifung und -motilität zu spielen (IJIRI et al. 2011).

### **Transfer der etablierten Methoden auf andere Papageienspezies**

Die an der Modellspezies Wellensittich erarbeiteten immunzytochemischen Methoden wurden erfolgreich auf sieben weitere Papageiengattungen (*Nymphicus*, *Eolophus*, *Cacatua*, *Psittacus*, *Amazona*, *Ara*, *Cyanopsitta*) aus unterschiedlichen Erdteilen übertragen. Alle der 14 etablierten Marker konnten bei diesen Tieren ebenfalls sichtbar gemacht werden. Lediglich die Verdünnungen der Antikörper mussten vereinzelt an das jeweilige Genus angepasst werden (siehe Tabelle 1, Publikation 2).

Im Gegensatz dazu beweisen die teilweise heterogenen zellulären Verteilungsmuster der verwendeten Marker (detaillierte Darstellung in Tabelle 3, Publikation 2), dass die an der Modellspezies erzielten Resultate nur eingeschränkt auf andere Papageienarten übertragbar sind. Die auffälligsten Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten zwischen den Spezies seien im Folgenden kurz beschrieben.

Im Unterschied zum Wellensittich wurde der AR bei Kakadus, Amazonen und Kongo-Graupapageien auch im inaktiven Reproduktionsstadium exprimiert. Wahrscheinlich fördern

die HSDs die Aktivierung der Steroidrezeptoren auf eine Liganden-unabhängige Weise (PILLAI et al. 1999) oder modulieren sie über Matrix-Metalloproteinasen (MMP) (LI et al. 2005). Die Tatsache, dass der AR bei Aras weder in Keimzellen noch im Nebenhoden und stattdessen nur in der Hodenkapsel nachweisbar war, spricht dafür, dass der verwendete Antikörper für diese Gattung nicht geeignet ist. Hier sind weiterführende Untersuchungen mit anderen AR-Markern erforderlich.

Bei Kakadus und Kongo-Graupapageien fand sich der PR zusätzlich in Leydig-Zellen. Dies stimmt mit Untersuchungen beim Säugetier überein, die Progesteron als Stimulator der Steroidogenese in den Leydig-Zellen betrachten (EL-HEFNAWY und HUHTANIEMI 1998, ROSSATO et al. 1999).

Hinsichtlich der HSDs waren nahezu übereinstimmende Resultate in allen untersuchten Papageien bei der Expression von  $3\beta$ -HSD und  $17\beta$ -HSD-2 festzustellen, was in erster Linie für die Beurteilung des Reproduktionsstatus von Bedeutung ist. Inaktive Wellensittiche wie auch Kakadus und Kongo-Graupapageien exprimierten  $17\beta$ -HSD-1 im Hoden- und Nebenhodengewebe, wohingegen sich bei Aras und Amazonen dieses Fortpflanzungsstadiums das Enzym nicht fand. Im Vergleich dazu präsentierten außer der Modellspezies alle inaktiven Psittaziden  $17\beta$ -HSD-7 (Abbildung 4J, Publikation 2). Beide zuletzt genannten steroidal Enzyme sind beim Säugetier als Marker für östrogenempfindliche Zellen und Gewebe bekannt (SONG et al. 2006). Ihr Nachweis in Keimzellen, somatischen Zellen und Nebenhoden-Epithel unterstreicht den Einfluss von Östrogenen auf den männlichen Geschlechtstrakt der Papageienvögel. Die Koexistenz von  $17\beta$ -HSD-1, -7 und ERA spricht für eine lokale Produktion von Östradiol (PELLETIER et al. 2004). Die variable Ausprägung der an der Östrogenbiosynthese beteiligten Enzyme deutet auf spezies-spezifische Unterschiede dieses Hormonsystems hin.

Bei den Relaxinpeptiden und ihren Rezeptoren zeigten alle untersuchten Spezies eine weitgehend homogene Verteilung. Das Relaxinsystem ist phylogenetisch sehr alt (IVELL et al. 2011). Möglicherweise war es daher schon vor der systematischen Aufspaltung der Gattungen vorhanden und hat sich demzufolge kaum verändert.

### **Spezies-spezifische Unterschiede**

Sowohl Makroskopie (Hodengröße in Relation zur Körpergröße), Histologie (Vorkommen von Pigmenten, Ausdehnung der Samenkanälchen und des Interstitiums) als auch Immunzytochemie (Vorkommen und zelluläre Verteilungsmuster der getesteten Marker) ergaben Unterschiede in Abhängigkeit von der untersuchten Spezies. Die Gründe für diese variablen Erscheinungsbilder sind vielfältig. Wellen- und Nymphensittiche beispielsweise sind opportunistische Spezies, deren Brutbeginn sich am optimalsten Zeitpunkt orientiert, in

den ariden Gebieten meist nach unvorhergesehenen Regenfällen (FORSHAW und COOPER 1981). Im Gegensatz zu den saisonalen Brütern (große Kakadus, Kongo-Graupapageien, Amazonen und Aras) halten sie ihre Gonaden in einem fortgeschrittenen Stadium der Spermatogenese, um den Fortpflanzungsaufwand angesichts günstiger Umweltbedingungen zu maximieren. Opportunistische Brüter sind also hinsichtlich der Veränderung ihrer Hodenaktivität flexibler, während saisonale Tiere klar definierte Reproduktionsstadien aufweisen (LOFTS und MURTON 1973, TRILLMICH 1976). Außerdem ist es entscheidend, dass die untersuchten Vögel aus unterschiedlichen klimatischen Zonen (Tropen oder Subtropen) stammen. Deshalb könnten Umgebungsfaktoren wie Photostimulation, Temperatur und Luftfeuchte ebenfalls die Fortpflanzungsaktivität, hormonelle Steuerung und demzufolge die Hodenfunktion beeinflussen (DAWSON und SHARP 2007). Vermutlich spielt auch der Unterschied zwischen Kolonie- und Einzelbrütern eine Rolle. Die Modellspezies ist hierbei die einzige der untersuchten Arten, die in Kolonien brütet. Die Konkurrenz um Nistgelegenheiten ist dabei zwischen den Individuen wesentlich stärker, was im Vergleich zu Einzelbrütern höhere Steroidhormonspiegel nach sich zieht. Tropische Vögel (wie Kakadus, Aras oder Amazonen) besitzen oftmals permanente Nahrungsreviere, die nicht von einem einzelnen Tier verteidigt werden können. Das Festhalten an diesen Territorien führt zur Ausbildung manifester Paarbindungen (ORING 1982). Diese wiederum spielen eine entscheidende Rolle im Dominanzverhalten, das unter anderem von Androgenen gesteuert wird (ARDIA et al. 2010). Demnach ist auch das Paarungssystem als ein weiterer einflussnehmender Faktor anzusehen. Sowohl Wellen- als auch Nymphensittiche zeigen polygames Verhalten (BALTZ und CLARK 1997, SPOON et al. 2007). Im Gegensatz dazu stehen perennierende Monogamie (d. h. ganzjährige Paarbindung auch außerhalb der Brut und Aufzucht) bei Kakadus (ORING 1982) und langfristige Paarbindungen bei Amazonen (RODRÍGUEZ CASTILLO und EBERHARD 2006). Bei Weißstirnamazonen (*Amazona albifrons*) konnte beispielsweise beobachtet werden, dass Tiere in festen Bindungen die ungepaarten Artgenossen dominierten (LEVINSON 1980). Polygamie wird ebenso von Veränderungen im Dominanz- und Balzverhalten begleitet, möglicherweise verbunden mit einer erhöhten Empfindlichkeit gonadaler Zellen gegenüber Hormonen und anderen Faktoren. Da das Paarungsverhalten zusätzlich vom Migrationsverhalten abhängt, sind Variationen zwischen Standvögeln (z. B. Braunkopfkakadu, *Calyptorhynchus lathamii*) und unregelmäßig wandernden Vögeln (z. B. Nomadismus wildlebender Nymphensittiche) denkbar (MYERS et al. 1989, PEPPER 1996). Bei Standvögeln funktionieren Paare als soziales Bündnis im Wettbewerb um Nahrungsquellen. Des Weiteren sind es evolutionäre Aspekte, die die spezies-spezifische Ausprägung von Rezeptor- oder Enzymsystemen beeinflussen können. Die Entwicklungsgeschichte der Papageienvögel ist aufgrund spärlicher Daten noch

weitgehend ungeklärt (FORSHAW 2006). Betrachtet man jedoch die Divergenz der *Cacatuidae* von den *Psittacidae* vor etwa 40 Millionen Jahren (WHITE et al. 2011), so sind auch evolutionsbedingte Ursachen zu vermuten.

Aufgrund der in dieser Arbeit feststellbaren spezies-spezifischen Unterschiede in Makroskopie, Histologie und Immunzytochemie ist eine individuelle Auswahl der Untersuchungsmethoden und zu verwendenden Marker in Abhängigkeit von der untersuchten Art unerlässlich.

### **Eignung der etablierten Marker zur Beurteilung der Reproduktionsaktivität**

Die etablierten immunzytochemischen Marker sind in unterschiedlichem Maße für die Beurteilung der Fortpflanzungsaktivität geeignet (siehe Tabelle 4, Publikation 2). Vergleicht man die intermediäre mit der aktiven Reproduktionsphase, so lassen sich ähnliche Muster hinsichtlich der Verteilung von Rezeptoren und Enzymen entdecken. So kann die intermediäre Phase mit dem Stadium der Akzeleration, also der Vorbereitung auf die aktive Phase mit maximaler Spermatogenese, gleichgesetzt werden. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass sich aktive und intermediäre Gonaden bezüglich endokrinologischer Gesichtspunkte weniger voneinander unterscheiden als in morphologischer Hinsicht. Im Gegensatz dazu waren beim inaktiven Status deutliche Differenzen zu den anderen beiden Phasen erkennbar. In erster Linie ist hier der Rückgang der steroidalen Enzymaktivität zu nennen. Die inaktive Reproduktionsphase ist bestimmt von einer herabregulierten Androgenbiosynthese, was bereits für andere Vogelspezies gezeigt werden konnte (BLAS et al. 2010, LEA et al. 2001, MILLAM 1999). Dass Steroidrezeptoren auch bei sexuell inaktiven Papageien im Hoden exprimiert werden, ist auch bei Säugern (KOHLENER et al. 2007, KONRAD et al. 1998) und Geflügel (SHANBHAG und SHARP 1996) in der gonadalen Ruhephase bekannt. Offenbar sind es dennoch die HSDs, denen die entscheidende Rolle in der Steuerung der Hodenaktivität zukommt. Die Anwesenheit dieser Steroid-metabolisierenden Enzyme ist nicht nur wichtig für die Steroidogenese, sondern auch für die Initiation von Androgen-, Östrogen- und Progesteronrezeptoren (EINSPANIER et al. 2009).

Als geeignete Marker für eine präzise Definition des Fortpflanzungsstadiums bei allen untersuchten Papageien haben sich 17 $\beta$ -HSD-2, 3 $\beta$ -HSD und SMA erwiesen. Hingegen sind die anderen steroidogenen Enzyme, Steroidrezeptoren, Relaxinpeptide und Ki67 in Abhängigkeit von der Spezies einzusetzen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in der vorliegenden Arbeit die Etablierung eines umfangreichen Spektrums von Markern für reproduzierbare immunzytochemische

Untersuchungen des Fortpflanzungsstatus männlicher *Psittaciformes* gelungen ist. In Verbindung mit dem histologischen Bild können so drei testikuläre Aktivitätsstufen unterschieden werden. Entscheidend sind die geeignete Auswahl der Antikörper und deren sinnvolle Kombination in Abhängigkeit der untersuchten Spezies. Die Resultate liefern grundlegende Informationen zur lokalen Steroidogenese und bilden somit den Ausgangspunkt für weitere Analysen, beispielsweise den Nachweis der etablierten Faktoren in Blut oder Faezes männlicher Papageien. Dies kann eine praxisrelevante, weniger invasive Alternative zur Endoskopie, gerade für die Untersuchung bedrohter Arten, darstellen.

Die unmittelbare Nutzbarkeit der immunzytochemischen Techniken für die Reproduktionsdiagnostik bei Papageienvögeln hängt entscheidend von der Weiterentwicklung der Probengewinnung mittels Biopsie ab. Im Rahmen von Zuchtprogrammen gefährdeter Spezies können nur Methoden zur Gewebeentnahme eingesetzt werden, die die Gesundheit der beprobten Vögel nicht unnötig gefährden. Gegenstand weiterer Forschungsansätze kann es sein, die in der Arbeit etablierten Marker an Gonaden mit pathologischen Veränderungen (z. B. Entzündungen oder Tumoren) zu testen. Solche Erkrankungen des Hodens sind vielfach verantwortlich für das Auftreten einer Infertilität (JOYNER 1994). Möglicherweise werden die Marker in betroffenen Hoden vermehrt oder vermindert exprimiert und können im Folgenden in der Diagnostik derartiger Fruchtbarkeitsstörungen von Nutzen sein.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Susanne Reitemeier, geb. Schneider

Morphologische und immunzytochemische Charakterisierung der Gonaden männlicher Papageienvögel

Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut und Klinik für Vögel und Reptilien der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig, Universität Leipzig

Eingereicht im September 2013

58 Seiten, 6 Abbildungen, 5 Tabellen, 225 Literaturangaben, 1 Anhang

Schlüsselwörter: *Psittaciformes*, Hoden, Histologie, Immunzytochemie, Reproduktionsstatus, Steroidbiosynthese

Gefährdete Spezies in Menschenobhut zu reproduzieren und zu erhalten soll dem weltweiten Rückgang zahlreicher Papageienarten entgegenwirken. Der Erfolg solcher Zuchtprogramme wird unter anderem durch begrenzte Kenntnisse über physiologische und pathologische Vorgänge im Fortpflanzungssystem dieser Vogelordnung erschwert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung aussagekräftiger Parameter zur Einordnung des Reproduktionsstatus von männlichen Papageienvögeln. Dabei wurde ein Probenumfang fixierter, männlicher Reproduktionsorgane acht verschiedener Gattungen mit standardisierten histologischen und immunzytochemischen Methoden untersucht. Im Vordergrund stand die morphologische Beurteilung der untersuchten Gonaden im Bezug auf Fortpflanzungsaktivität und -status. Gleichzeitig sollten die immunzytochemischen Analysen Aufschluss über die beteiligten Hormone und Enzyme geben. Für die Etablierung vogel-spezifischer Marker wurde als Vertreter der *Psittaciformes* der Wellensittich (*Melopsittacus undulatus*, n=45) als Modellspezies ausgewählt. 15 verschiedene Antikörper aus der Gruppe der Steroidrezeptoren, steroidogenen Enzyme, Relaxinpeptide und Proliferationsmarker wurden an dieser Art getestet. Anschließend erfolgte der Transfer der erarbeiteten Methodik auf sieben weitere Papageiengattungen (*Nymphicus, Eolophus, Cacatua, Psittacus, Amazona, Ara, Cyanopsitta*).

Anhand der Histologie konnten alle untersuchten Gonaden den drei verschiedenen Reproduktionsstadien aktiv, intermediär und inaktiv zugeordnet werden. Hierbei wurden Kriterien wie die Ausdehnung von Samenkanälchen und Interstitium, Morphologie des Keimepithels, Vorhandensein von Lipofuszin in den Samenkanälchen sowie die

Teilungsaktivität von Keimzellen herangezogen. Aktive Hoden zeigen ausgedehnte Tubuli und ein schmales Interstitium, ein Keimepithel mit allen Keimzellstadien, wenig Lipofuszin und eine hohe Teilungsaktivität bei den Keimzellen. Inaktive Hoden hingegen besitzen schmale Tubuli und ein breites Interstitium, ein Keimepithel bestehend aus Sertoli-Zellen und Spermatogonien, Massen an Lipofuszin im Lumen der Samenkanälchen und eine geringe Proliferationsrate der Keimzellen.

14 der 15 getesteten Marker konnten mittels Immunzytochemie erfolgreich am Wellensittich etabliert werden. Hinsichtlich der Einordnung des Reproduktionsstatus war in erster Linie ein Absinken der steroidogenen Enzymaktivität von  $3\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD) und  $17\beta$ -HSD-2 bei sexuell inaktiven gegenüber aktiven und intermediären Tieren zu verzeichnen. Auch der Androgenrezeptor (AR) wurde im Ruhestadium nicht mehr exprimiert. Die übrigen Steroidrezeptoren, steroidogenen Enzyme und Relaxinpeptide zeigten variable zelluläre Verteilungsmuster, die keine klare Aussage zum Fortpflanzungsstatus zuließen. Dennoch konnten anhand der Lokalisation dieser Faktoren in Keimzellen, somatischen Zellen des Hodens und Zellen des Nebenhodenepithels funktionelle Gesichtspunkte geklärt werden. Beispielsweise zeigte die Koexistenz des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  und des steroidogenen Enzyms Aromatase in Hoden und Nebenhoden, dass nicht nur androgene Einflüsse in die Steuerung der Gonaden involviert sind. Auch der erstmalige Nachweis von Relaxin, Relaxin-like factor und ihren Rezeptoren in testikulären und epididymalen Zellen deutet darauf hin, dass diese die Funktion der beim Vogel nicht vorhandenen Prostata übernehmen.

Zudem ist der Transfer der etablierten immunzytochemischen Methoden auf sieben weitere Papageieengattungen (*Nymphicus*, *Eolophus*, *Cacatua*, *Psittacus*, *Amazona*, *Ara*, *Cyanopsitta*) gelungen. Auch hier konnten 14 Marker in verschiedenen Zellen von Hoden und Nebenhoden sichtbar gemacht werden. Die teilweise heterogene Verteilung der Marker in verschiedenen Zelltypen war eindeutig spezies-abhängig. Dies hat gezeigt, dass die beim Wellensittich mittels Immunzytochemie erzielten Resultate nur eingeschränkt auf andere Papageienspezies übertragbar sind. Entscheidend für die Beurteilung des Reproduktionsstatus ist daher die individuelle Auswahl der Marker in Abhängigkeit von der untersuchten Spezies.

Die Resultate dieser Studie liefern die Grundlage für weitere Forschungsansätze in der Reproduktionsdiagnostik von Papageienvögeln. Zum einen können die etablierten Marker in Analyse-Systemen zum Einsatz kommen, die nicht-invasiv gewonnene Medien (z. B. Faezes) untersuchen und vor allem in Züchterhaltungsprogrammen bedrohter Arten hilfreich sind. Zum anderen ist die immunzytochemische Untersuchung von Hodenbiopsaten pathologisch veränderter Hoden (z. B. Tumoren oder Entzündungen) als eine sinnvolle Ergänzung der Diagnostik von Infertilität bei männlichen Psittaziden anzusehen.

## 6 SUMMARY

Susanne Reitemeier, née Schneider

Morphological and immunocytochemical characterization of male parrots' gonads

Institute of Physiological Chemistry and Clinic for Birds and Reptiles, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in September 2013

58 pages, 6 figures, 5 tables, 225 references, 1 appendix

Keywords: *Psittaciformes*, testes, histology, immunocytochemistry, reproductive status, steroid biosynthesis

Captive breeding and conservation of endangered *Psittaciformes* aim to rebalance the worldwide decline of numerous parrot species. The success of these breeding programmes is limited by the sparse knowledge about physiological and pathological processes in the reproductive system of this bird order.

The aim of the present study was the establishment of reliable markers to characterize the reproductive status of male parrots. For this purpose, formalin-fixed gonadal samples of eight different psittacine genera were analysed using standardized histological and immunocytochemical methods. The main focus was the morphological assessment of the testes concerning the reproductive activity and –status. Furthermore, the immunocytochemical investigation will provide information about the hormones and enzymes involved. For the establishment of avian-specific markers, the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*, n=45) was chosen as a model species, in representation of the *Psittaciformes*. 15 different antibodies from the group of steroid receptors, steroidogenic enzymes, relaxin peptides and proliferation markers were tested on this species. The developed methods were subsequently transferred to seven further parrot genera (*Nymphicus*, *Eolophus*, *Cacatua*, *Psittacus*, *Amazona*, *Ara*, *Cyanopsitta*).

Using the histological investigation, all gonads were categorized into active, intermediate or non-active reproductive status. This included the application of criteria like seminiferous tubular and interstitial diameters, morphology of the germinal epithelium, presence of lipofuscin in the seminiferous tubules as well as the mitotic activity of germ cells. Active testes displayed large tubules and small interstitium, a germinal epithelium consisting of all germ cell stages, less lipofuscin and high mitotic activity of germ cells. In contrast, non-active testes

have small tubuli and an expanded interstitium, a germinal epithelium only composed of Sertoli cells and spermatogonia, masses of lipofuscin in the centres of seminiferous tubules and germ cells with a low proliferation rate.

Via immunocytochemistry, 14 of the 15 tested markers were successfully established for the budgerigar. According to the assessment of the reproductive status, the predominant finding was the declined steroidogenic enzyme activity of  $3\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase (HSD) and  $17\beta$ -HSD-2 in sexually non-active birds compared to active and intermediate ones. In addition, the androgen receptor (AR) was also not expressed in quiescent stadium. The other steroid receptors, steroidogenic enzymes and relaxin peptides showed variable cellular distribution patterns, which do not allow a clear statement regarding the reproductive status. However, the localization of these factors in germ, somatic and epididymal epithelial cells provided information about functional aspects. The co-existence of oestrogen receptor ER $\alpha$  and the steroidogenic enzyme aromatase in testis and epididymis, for example, demonstrated that not only androgens are involved in the hormonal regulation of the gonads. Also the first evidence of relaxin, relaxin-like factor and their receptors indicates testicular and epididymal cells to replace the non-existent prostate in birds.

Moreover, the transfer of the established immunocytochemical methods on seven other parrot genera turned out to be effective. Here again, 14 markers were visualized in different cells of testis and epididymis. Their partly heterogenous distribution in various cell types was definitely species-specific. This evinced the limited transferability of the results achieved in the budgerigar to other psittacine species. Therefore, the individual selection of markers subject to the investigated species plays a pivotal role for the characterization of the reproductive status.

The results of the study provide a basis for further research concerning reproductive diagnostics in parrots. Firstly, the established markers could be applied in systems analyzing non-invasively derived media (e.g. faeces) and hence be auxiliary in breeding programmes of endangered species. Secondly, the immunocytochemical investigation of biopsies from pathologically altered testes (e.g. tumor, inflammation) could be considered as a valuable complement to the diagnostics of infertile male psittacines.

---

**7 LITERATURVERZEICHNIS**

- Agoulnik AI. Relaxin and related peptides in male reproduction. *Adv Exp Med Biol.* 2007;612:49–64.
- Aire TA. Cyclical reproductive changes in the non-ciliated epithelia of the epididymis of birds. *Anat Histol Embryol.* 2002a;31(2):113–8.
- Aire TA. Morphological changes in the efferent ducts during the main phases of the reproductive cycle of birds. *J Morphol.* 2002b;253(1):64–75.
- Aire TA. Micro-stereological study of the avian epididymal region. *J Anat.* 1979;129(4):703.
- Aire TA. The ductuli efferentes of the epididymal region of birds. *J Anat.* 1980;130(4):707.
- Aire TA. The rete testis of birds. *J Anat.* 1982;135(1):97–110.
- Aire TA, Ozegbe PC. The testicular capsule and peritubular tissue of birds: morphometry, histology, ultrastructure and immunohistochemistry. *J Anat.* 2007;210(6):731–40.
- Aire TA, Ozegbe PC. Immunohistochemistry of the cytoskeleton in the excurrent ducts of the testis in birds of the Galloanserae monophyly. *Cell Tissue Res.* 2008;333(2):311–21.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. The cytoskeleton. In: Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, Hrsg. *Molecular biology of the cell.* 2. Aufl. New York, London: Garland Pub; 1989. p. 613–29.
- Anthony RG, Buss IO. Relationship of Gonadal Recrudescence and Testicular Melanogenesis in California Quail. *Condor.* 1974;76(4):452–7.
- Ardia DR, Broughton DR, Gleicher MJ. Short-term exposure to testosterone propionate leads to rapid bill color and dominance changes in zebra finches. *Horm Behav.* 2010;58(3):526–32.
- Aumuller G, Seitz J. Immunocytochemical localization of actin and tubulin in rat testis and spermatozoa. *Histochemistry.* 1988;89(3):261–7.
- Bahr JM, Dalponte M, Janssen S, Bunick D, Nakai M. Ion transporters for fluid reabsorption in the rooster (*Gallus domesticus*) epididymal region. *Anim Reprod Sci.* 2006;95(3-4):331–7.
- Balthazart J, Foidart A, Wilson EM, Ball GF. Immunocytochemical localization of androgen receptors in the male songbird and quail brain. *J Comp Neurol.* 1992;317(4):407–20.

- Baltz AP, Clark AB. Extra-pair courtship behaviour of male budgerigars and the effect of an audience. *Anim Behav.* 1997;53(5):1017–24.
- Bamberg E. Chemie, Biochemie und Nachweis der Steroidhormone. In: Döcke F, Hrsg. *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. 3. Aufl. Jena [u.a.]: Fischer; 1994.
- Bani D. Relaxin: a pleiotropic hormone. *Gen Pharmacol.* 1997;28(1):13–22.
- Bani G, Sacchi TB, Bigazzi M. Response of the pigeon crop sac to mammatrophic hormones: comparison between relaxin and prolactin. *Gen Comp Endocrinol.* 1990;80(1):16–23.
- Bathgate RAD, Halls ML, van der Westhuizen ET, Callander GE, Kocan M, Summers RJ. Relaxin family peptides and their receptors. *Physiol Rev.* 2013;93(1):405–80.
- Bauchinger U, Van't Hof T, Biebach H. Testicular development during long-distance spring migration. *Horm Behav.* 2007;51(3):295–305.
- Behncke H. Spermagewinnung und -untersuchung sowie endoskopische Beurteilung des Geschlechtsapparats in Abhängigkeit von der Spermaproduktion bei Psittaziden am Beispiel des Wellensittichs (*Melopsittacus undulatus*). [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2002.
- Belle MD, Lea RW. Androgen receptor immunolocalization in brains of courting and brooding male and female ring doves (*Streptopelia risoria*). *Gen Comp Endocrinol.* 2001;124(2):173–87.
- Bentley GE, Moore IT, Sower SA, Wingfield JC. Evidence for a novel gonadotropin-releasing hormone in hypothalamic and forebrain areas in songbirds. *Brain Behav Evol.* 2003;63(1):34–46.
- BirdLife International. BirdLife checklist of the birds of the world, with conservation status and taxonomic sources: Family search: *Psittacidae* (Parrots). 2013 (zitiert vom 7.3.2013) <<http://www.birdlife.org/datazone/species/search>>.
- Birkhead TR. Male reproductive system, birds. In: Knobil E, Neill JD, Hrsg. *Encyclopedia of reproduction*, Vol. 3. San Diego: Academic Press; 1998. p. 15–9.
- Blanco JM, Wildt DE, Hofle U, Voelker W, Donoghue AM. Implementing artificial insemination as an effective tool for ex situ conservation of endangered avian species. *Theriogenology.* 2009;71(1):200–13.
- Blas J, López L, Tanferna A, Sergio F, Hiraldo F. Reproductive endocrinology of wild, long-lived raptors. *Gen Comp Endocrinol.* 2010;168(1):22–8.

- Boonyaratanakornkit V, Edwards DP. Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids. In: Seminars in reproductive medicine. New York: Thieme Medical Publishers; 2007. p. 139–53.
- Bowles H. Evaluating and treating the reproductive system. In: Harrison GJ, Lightfoot TL, Hrsg. Clinical avian medicine. Palm Beach, Florida: Spix Publishing; 2006. p. 519–39.
- Bozkurt HH, Aktaş A, Ulkay MB, Fırat UB. Sertoli cell proliferation during the post hatching period in domestic fowl. J Vet Sci. 2007;8(3):219–22.
- Brackett KH, Fields PA, Dubois W, Chang SM, Mather FB, Fields MJ. Relaxin: an ovarian hormone in an avian species (*Gallus domesticus*). Gen Comp Endocrinol. 1997;105(2):155–63.
- Brehm R, Rey R, Kliesch S, Steger K, Marks A, Bergmann M. Mitotic activity of Sertoli cells in adult human testis: an immunohistochemical study to characterize Sertoli cells in testicular cords from patients showing testicular dysgenesis syndrome. Anat Embryol. 2006;211(3):223–36.
- Brock MK. Semen Collection and Artificial Insemination in the Hispaniolan Parrot (*Amazona ventralis*). J Zoo Wildl Med. 1991;22(1):107–14.
- Brunk UT, Terman A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. Free Radic Biol Med. 2002;33(5):611–9.
- Canoine V, Fusani L, Schlinger B, Hau M. Low sex steroids, high steroid receptors: Increasing the sensitivity of the nonreproductive brain. Dev Neurobiol. 2007;67(1):57–67.
- Cardoso LC, Nascimento AR, Royer C, Porto CS, Lazari MFM. Locally produced relaxin may affect testis and vas deferens function in rats. Reproduction. 2010;139(1):185–96.
- Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: A review. Reprod Biol Endocrinol. 2003;1:35.
- Christidis L, Boles W. Systematics and Taxonomy of Australian Birds. Melbourne: Csiro Publishing; 2008.
- Christidis L, Schodde R, Shaw DD, Maynes SF. Relationships among the Australo-Papuan parrots, lorikeets, and cockatoos (Aves: *Psittaciformes*): Protein evidence. Condor. 1991:302–17.
- CITES. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. 2012 (zitiert vom 14.5.2013) <<http://www.cites.org/eng/app/appendices.php>>.

- Clubb S. Reproductive assessment in psittacine birds. Conference Proceedings of the Association of Avian Veterinarians; San Antonio; 2006. p. 121–5.
- Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fugua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS et al. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev.* 2006;58(4): 773–81.
- Daniell A, Murray ND. Effects of inbreeding in the budgerigar *Melopsittacus undulatus* (Aves: *Psittacidae*). *Zoo Biol.* 1986;5(2):233–8.
- Dawson A, King VM, Bentley GE, Ball GF. Photoperiodic Control of Seasonality in Birds. *J Biol Rhythms.* 2001;16(4):365–80.
- Dawson A, Sharp PJ. Photorefractoriness in birds--photoperiodic and non-photoperiodic control. *Gen Comp Endocrinol.* 2007;153(1-3):378–84.
- Dornas RAP, Oliveira AG, Dias MO, Mahecha GAB, Oliveira CA. Comparative expression of androgen receptor in the testis and epididymal region of roosters (*Gallus domesticus*) and drakes (*Anas platyrhynchos*). *Gen Comp Endocrinol.* 2008;155(3):773–9.
- Duval D, Durant S, Homo-Delarche F. Non-genomic effects of steroids Interactions of steroid molecules with membrane structures and functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* 1983; 737(3):409–42.
- Einspanier A, Lieder K, Husen B, Ebert K, Lier S, Einspanier R et al. Relaxin supports implantation and early pregnancy in the marmoset monkey. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1160:140–6.
- El-Hefnawy T, Huhtaniemi I. Progesterone can participate in down-regulation of the luteinizing hormone receptor gene expression and function in cultured murine Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1998;137(2):127–38.
- Erickson CJ. Induction of ovarian activity in female ring doves by androgen treatment of castrated males. *J Comp Physiol Psychol.* 1970;71(2):210–5.
- Esponda P, Bedford JM. Surface of the rooster spermatozoon changes in passing through the Wolffian duct. *J Exp Zool.* 1985;234(3):441–9.
- Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 1988;240(4854):889–95.
- Feder HH, Storey A, Goodwin D, Reboulleau C, Silver R. Testosterone and "5 $\alpha$ -dihydrotestosterone" levels in peripheral plasma of male and female ring doves (*Streptopelia risoria*) during and reproductive cycle. *Biol Reprod.* 1977;16(5):666–77.

- Follett BK. Photoperiodism and seasonal breeding in birds and mammals. In: Crighton CB, Foxcroft GR, Haynes NB, Lamming GE, Hrsg. Control of Ovulation. London: Butterworths; 1978. p. 267–93.
- Forshaw JM. Parrots of the World. Princeton, Oxford: Princeton University Press; 2006.
- Forshaw JM, Cooper WT. Australian parrots. 2. Aufl. Melbourne, New York: Lansdowne Editions; 1981.
- Fraissinet M, Varriale B, Pierantoni R, Caliendo MF, Di Matteo L, Bottoni L et al. Annual testicular activity in the gray partridge (*Perdix perdix L.*). Gen Comp Endocrinol. 1987;68(1):28–32.
- Freking F, Nazairians T, Schlinger BA. The expression of the sex steroid-synthesizing enzymes CYP11A1, 3beta-HSD, CYP17, and CYP19 in gonads and adrenals of adult and developing zebra finches. Gen Comp Endocrinol. 2000;119(2):140–51.
- Furuya M, Adachi K, Kuwahara S, Ogawa K, Tsukamoto Y. Inhibition of male chick phenotypes and spermatogenesis by Bisphenol-A. Life Sci. 2006;78(15):1767–76.
- Gahr M. Localization of androgen receptors and estrogen receptors in the same cells of the songbird brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87(23):9445–8.
- Galván I, Møller AP, Erritzøe J. Testicular melanization has evolved in birds with high mtDNA mutation rates. J Evol Biol. 2011;24(5):988–98.
- Garamszegi LZ, Eens M, Hurtrez-Boussès S, Møller AP. Testosterone, testes size, and mating success in birds: a comparative study. Horm Behav. 2005;47(4):389–409.
- Gartrell BD. Assessment of the Reproductive State in Male Swift Parrots (*Lathamus discolor*) by Testicular Aspiration and Cytology. J Avian Med Surg. 2002;16(3):211–7.
- Gatter KC, Dunnill MS, Gerdes J, Stein H, Mason DY. New approach to assessing lung tumours in man. J Clin Pathol. 1986;39(6):590–3.
- Gerstberger R. Reproduktion beim Vogel. In: Engelhardt W von, Breves G, Hrsg. Physiologie der Haustiere: Enke Ferdinand; 2009. p. 580–96.
- Glander HJ, Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. Mol Hum Reprod. 1999;5(2):109–15.
- Gonzalez-Moran MG, Gonzalez-Arenas A, German-Castelan L, Camacho-Arroyo I. Changes in the content of sex steroid hormone receptors in the growing and regressing ovaries of *Gallus domesticus* during development. Gen Comp Endocrinol. 2013;189:51–8.

- Goymann W, Geue D, Schwabl I, Flinks H, Schmidl D, Schwabl H et al. Testosterone and corticosterone during the breeding cycle of equatorial and European stonechats (*Saxicola torquata axillaris* and *S. t. rubicola*). *Horm Behav.* 2006;50(5):779–85.
- Goymann W, Möstl E, Gwinner E. Non-invasive methods to measure androgen metabolites in excrements of European stonechats, *Saxicola torquata rubicola*. *Gen Comp Endocrinol.* 2002;129(2):80–7.
- Gwinner E. Einfluß der Photoperiode auf das circannuale System des Halsbandschnäppers (*Ficedula albicollis*) und des Trauerschnäppers (*F. hypoleuca*). *J Ornithol.* 1989;130(1):1-13.
- Hahn A. Einordnung des Reproduktionsstatus durch endokrine Analyse bei verschiedenen männlichen Papageienspezies (*Psittaciformes*) [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2010.
- Hahn A, Reitemeier S, Gottschalk J, Haense M, Schmidt V, Steinbach-Sobiraj K et al. Endocrinologic studies of male psittacine birds for the evaluation of their reproductive status. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere.* 2011;39(4):249–57.
- Halldin K, Axelsson J, Holmgren C, Brunstrom B. Localization of estrogen receptor-alpha and -betamRNA in brain areas controlling sexual behavior in Japanese quail. *J Neurobiol.* 2006;66(2):148–54.
- Hammer S, Watson R. The challenge of managing Spix Macaws (*Cyanopsitta spixii*) at Qatar - an eleven-year retrospection. *Zool Gart.* 2012;81(2–3):81–95.
- Hänse M. Die Beurteilung reproduktionszyklischer Änderungen der Hodenmorphologie und der Spermaqualität bei Vögeln der Ordnung *Psittaciformes* [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2012.
- Hänse M, Schmidt V, Schneider S, DellaVolpe A, Krautwald-Junghanns M. Comparative Examination of Testicular Biopsy Samples and Influence on Semen Characteristics in Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *J Avian Med Surg.* 2008;22(4):300–9.
- Hanukoglu I. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992;43(8):779–804.
- Harcourt-Brown NH. Diagnostic imaging. In: Harcourt-Brown NH, Chitty J, Hrsg. *BSAVA manual of psittacine birds*. Ames, Iowa: Blackwell Pub Professional; 2005. p. 97–106.
- Hatt J. Zucht, Reproduktion, Brut. In: Kaleta EF, Krautwald-Junghanns ME, Hrsg. *Kompendium der Ziervogelkrankheiten: Papageien - Tauben - Sperlingsvögel*. Hannover: Schlütersche; 2007. p. 32–8.

- Hattori A, Ishii S, Wada M. Effects of two kinds of chicken luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH), mammalian LH-RH and its analogs on the release of LH and FSH in Japanese quail and chicken. *Gen Comp Endocrinol.* 1986;64(3):446–55.
- Hau M. Timing of breeding in variable environments: tropical birds as model systems. *Horm Behav.* 2001;40(2):281–90.
- Higgins PJ. Handbook of Australian, New Zealand & Antarctic Birds. Vol. 4, Parrots to Dollarbird: Oxford University Press Melbourne; 1999.
- Hisaw FL, Zarrow MX. The physiology of relaxin. *Vitam Horm.* 1950;8:151–78.
- Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W. Atomic model of the actin filament. *Nature.* 1990;347(6288):44–9.
- Hombach-Klonisch S. Rolle der Relaxin-artigen Peptide in der Tumorbologie der Schilddrüse [Habilitation Dr. med. habil.]. Halle-Wittenberg: Martin-Luther-Univ.; 2004.
- Homberger DG. Classification and the Status of Wild Populations of Parrots. In: Luescher AU, Hrsg. *Manual of Parrot Behavior.* Ames, Iowa: Blackwell Publishing Professional; 2006. p. 3–11.
- Horne MJ, Adeniran AJ. Primary diffuse large B-cell lymphoma of the testis. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(10):1363–7.
- Hsu SY, Kudo M, Chen T, Nakabayashi K, Bhalla A, van der Spek PJ et al. The three subfamilies of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptors (LGR): identification of LGR6 and LGR7 and the signaling mechanism for LGR7. *Mol Endocrinol.* 2000;14(8):1257–71.
- Hsu SY, Nakabayashi K, Nishi S, Kumagai J, Kudo M, Sherwood OD et al. Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science.* 2002;295(5555):671–4.
- Hummel G. Männliche Geschlechtsorgane. In: Hummel G, Hrsg. *Anatomie und Physiologie der Vögel: Kompendium für Studium und Praxis.* Stuttgart: Ulmer; 2000. p. 170–6.
- Humphreys PN. Ultrastructure of the budgerigar testis during a photoperiodically induced cycle. *Cell Tissue Res.* 1975;159(4):541–50.
- Ijiri TW, Merdushev T, Cao W, Gerton GL. Identification and validation of mouse sperm proteins correlated with epididymal maturation. *Proteomics.* 2011;11(20):4047–62.
- Im JE, Song SH, Kim JY, Kim KL, Baek SH, Lee DR et al. Vascular differentiation of multipotent spermatogonial stem cells derived from neonatal mouse testis. *Exp Mol Med.* 2012;44(4):303–9.

- Isola JJ. Distribution of estrogen and progesterone receptors and steroid-regulated gene products in the chick oviduct. *Mol Cell Endocrinol.* 1990;69(2-3):235–43.
- IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species, Version 2013.1: Keyword Search: *Psittaciformes*. 2013 (zitiert vom 3.7.2013) <<http://www.iucnredlist.org/>>.
- Ivell R, Anand-Ivell R. Biology of insulin-like factor 3 in human reproduction. *Hum Reprod Update.* 2009;15(4):463–76.
- Ivell R, Kotula-Balak M, Glynn D, Heng K, Anand-Ivell R. Relaxin family peptides in the male reproductive system--a critical appraisal. *Mol Hum Reprod.* 2011;17(2):71–84.
- Joyner KL. Theriogenology. In: Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR, Hrsg. *Avian medicine: Principles and application.* Lake Worth, Florida: Wingers Publishing; 1994. p. 754–804.
- Kanda I, Akazome Y, Ogasawara O, Mori T. Expression of cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase during embryogenesis in chicken adrenal glands and gonads. *Gen Comp Endocrinol.* 2000;118(1):96–104.
- Kawamura K, Kumagai J, Sudo S, Chun S, Pisarska M, Morita H et al. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(19):7323–8.
- Kim IS, Yang HH. Seasonal changes of testicular weight, sperm production, serum testosterone, and in vitro testosterone release in Korean ring-necked pheasants (*Phasianus colchicus karpow*). *J Vet Med Sci.* 2001;63(2):151–6.
- Kirby JD, Froman DP. Reproduction in Male Birds. In: Sturkie PD, Whittow GC, Hrsg. *Sturkie's Avian Physiology: Academic Press;* 2000. p. 597–615.
- Klasing KC. Potential impact of nutritional strategy on noninvasive measurements of hormones in birds. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1046:5–16.
- Klonisch T, Müller-Huesmann H, Riedel M, Kehlen A, Bialek J, Radestock Y et al. INSL3 in the benign hyperplastic and neoplastic human prostate gland. *Int J Oncol.* 2005;27(2):307–15.
- Kohler C, Riesenbeck A, Hoffmann B. Age-dependent expression and localization of the progesterone receptor in the boar testis. *Reprod Domest Anim.* 2007;42(1):1–5.
- Kohsaka T, Kato S, Qin S, Minagawa I, Yogo K, Kawarasaki T et al. Identification of boar testis as a source and target tissue of relaxin. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1160:194–6.

- König HE, Bragulla H, Liebich H, Korbel R. Männliche Geschlechtsorgane (*Organa genitalia masculina*). In: König HE, Hrsg. Anatomie der Vögel: Klinische Aspekte und Propädeutik ; Zier-, Greif-, Zoo-, Wildvögel und Wirtschaftsgeflügel. 2. Aufl. Stuttgart, New York: Schattauer; 2009. p. 149–56.
- Konrad L, Weber MA, Groos S, Albrecht M, Aumüller G. Paracrine interaction in testicular somatic cells. *Ital J Anat Embryol.* 1998;103(4 Suppl 1):139–52.
- Korenbrodt CC, Schomberg DW, Erickson CJ. Radioimmunoassay of plasma estradiol during the breeding cycle of ring doves (*Streptopelia risoria*). *Endocrinology.* 1974;94(4):1126–32.
- Krishnaprasadan TN, Kotak VC, Sharp PJ, Schmedemann R, Haase E. Environmental and hormonal factors in seasonal breeding in free-living male Indian rose-ringed parakeets (*Psittacula krameri*). *Horm Behav.* 1988;22(4):488–96.
- Kumagai J, Hsu SY, Matsumi H, Roh J, Fu P, Wade JD et al. INSL3/Leydig insulin-like peptide activates the LGR8 receptor important in testis descent. *J Biol Chem.* 2002;277(35):31283–6.
- Kwon S, Hess RA, Bunick D, Kirby JD, Bahr JM. Estrogen receptors are present in the epididymis of the rooster. *J Androl.* 1997;18(4):378–84.
- Kwon S, Hess RA, Bunick D, Nitta H, Janulis L, Osawa Y et al. Rooster testicular germ cells and epididymal sperm contain P450 aromatase. *Biol Reprod.* 1995;53(6):1259–64.
- Lake PE. Fowl semen as collected by the massage method. *J Agric Sci.* 1957;49(01):120.
- Lake PE. Male genital organs. In: King AS, McLelland J, Hrsg. Form and function in birds, Vol. 2. London: Academic Press; 1981. p. 1–61.
- Lake PE, McIndoe WM. The glutamic acid and creatine content of cock seminal plasma. *Biochem J.* 1959;71(2):303–6.
- Lambert K, Reinschmidt M. Papageien der Welt. Stuttgart: Ulmer; 2006.
- Langohr IM, Garner MM, Kiupel M. Somatotroph pituitary tumors in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Vet Pathol.* 2012;49(3):503–7.
- Lantermann W. Wellensittich. In: Papageienkunde: Biologie Verhalten - Haltung - Artenauswahl der Sittiche und Papageien. Berlin: Parey; 1999a. p. 422–7.
- Lantermann W. Papageienkunde: Biologie Verhalten - Haltung - Artenauswahl der Sittiche und Papageien. Berlin: Parey; 1999b.

- Lea RW, Clark JA, Tsutsui K. Changes in central steroid receptor expression, steroid synthesis, and dopaminergic activity related to the reproductive cycle of the ring dove. *Microsc Res Tech.* 2001;55(1):12–26.
- Lemazurier E, Séralini G. Evidence for sulfatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activities in equine epididymis and uterus. *Theriogenology.* 2002;58(1):113–21.
- Levinson ST. The social behavior of the White-fronted Amazon (*Amazona albifrons*). In: Conservation of new world parrots. Proceedings of the second ICBP Parrot Working Group Meeting: St. Lucia, 1980: Smithsonian Institution Press for the International Council for Bird Preservation; 1980. p. 403–17.
- Li Y, Isomaa V, Pulkka A, Herva R, Peltoketo H, Vihko P. Expression of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, P450 aromatase, and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1, 2, 5 and 7 mRNAs in human early and mid-gestation placentas. *Placenta.* 2005;26(5):387–92.
- Lierz M. Diagnostic value of endoscopy and biopsy. In: Harrison GJ, Lightfoot TL, Hrsg. Clinical avian medicine. Palm Beach, Florida: Spix Publishing; 2006. p. 631–52.
- Lierz M, Reinschmidt M, Müller H, Wink M, Neumann D. A novel method for semen collection and artificial insemination in large parrots (*Psittaciformes*). *Sci. Rep.* 2013;3:2066.
- Livezey BC, Zusi RL. Higher-order phylogeny of modern birds (Theropoda, Aves: *Neornithes*) based on comparative anatomy. II. Analysis and discussion. *Zool J Linn Soc.* 2007;149(1):1–95.
- Lofts B, Murton RK. Reproduction in birds. In: Farner DS, King JR, Hrsg. Avian biology, Vol. 3. New York, London: Academic Press; 1973. p. 1–107.
- Madekurozwa M, Chabvepi TS, Matema S, Teerds KJ. Relationship between seasonal changes in spermatogenesis in the juvenile ostrich (*Struthio camelus*) and the presence of the LH receptor and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Reproduction.* 2002;123(5):735–42.
- Madekurozwa MC. Progesterone and oestrogen receptor immunoreactivity in the vagina of the immature ostrich, *Struthio camelus*. *Br Poult Sci.* 2002a;43(3):450–6.
- Madekurozwa MC. A study of the immunohistochemical localization of the progesterone and oestrogen receptors in the magnum of the immature ostrich, *Struthio camelus*. *Anat Histol Embryol.* 2002b;31(5):317–20.

- Maitra SK, Dey M. Importance of photoperiods in determining temporal pattern of annual testicular events in rose-ringed parakeet (*Psittacula krameri*). J Biol Rhythms. 1992;7(1):13–25.
- Maretta M, Maretová E. Immunohistochemical demonstration of myoid cells in the testis and its excurrent ducts in the domestic fowl. Br Poult Sci. 2004;45(5):585–9.
- Marshall AJ. Biology and comparative physiology of birds: Academic Press; 1961.
- Matsunaga M, Ukena K, Tsutsui K. Androgen biosynthesis in the quail brain. Brain Res. 2002;948(1-2):180–5.
- McKinnell C, Mitchell RT, Morris K, Anderson RA, Kelnar CJH, Wallace WH et al. Perinatal germ cell development and differentiation in the male marmoset (*Callithrix jacchus*): similarities with the human and differences from the rat. Hum Reprod. 2013;28(4):886–96.
- Michel G. Männliches Geschlechtssystem. In: Salomon F, Hrsg. Lehrbuch der Geflügelanatomie. Jena, Stuttgart: Gustav Fischer; 1993. p. 197–209.
- Millam JR. Reproductive management of captive parrots. Vet Clin North Am Exot Anim Pract. 1999;2(1):93–110.
- Miller WL. Steroidogenic enzymes. Endocr Dev. 2008;13:1–18.
- Miyamoto K, Hasegawa Y, Nomura M, Igarashi M, Kangawa K, Matsuo H. Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984;81(12):3874–8.
- Myers SA, Millam JR, el Halawani ME. Plasma LH and prolactin levels during the reproductive cycle of the cockatiel (*Nymphicus hollandicus*). Gen Comp Endocrinol. 1989;73(1):85–91.
- Neumann D, Kaleta EF, Lierz M. Semen collection and artificial insemination in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) -A potential model for psittacines. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere. 2013;41(2):101–5.
- Ninnes C, Waas JR, Ling N, Nakagawa S, Banks JC, Bell DG et al. Comparing plasma and faecal measures of steroid hormones in Adelie penguins *Pygoscelis adeliae*. J Comp Physiol B. 2010;180(1):83–94.
- Oko R, Hermo L, Hecht NB. Distribution of actin isoforms within cells of the seminiferous epithelium of the rat testis: evidence for a muscle form of actin in spermatids. Anat Rec. 1991;231(1):63–81.

- Okulicz WC. Immunocytochemistry. In: Knobil E, Neill J, Hrsg. Encyclopedia of reproduction, Vol. 2. San Diego: Academic Press; 1998. p. 789–98.
- Oliveira AG, Dornas RA, Mahecha GA, Oliveira CA. Occurrence and cellular distribution of estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  in the testis and epididymal region of roosters. Gen Comp Endocrinol. 2011;170(3):597–603.
- O'Malley B. Avian anatomy and physiology. In: Clinical anatomy and physiology of exotic species: Structure and function of mammals, birds, reptiles, and amphibians. Edinburgh, New York: Elsevier Saunders; 2005. p. 97–161.
- Oring LW. Avian mating systems. In: Farner DS, King JR, Parkes KC, Hrsg. Avian Biology, Vol. 6. New York, London: Academic Press; 1982. p. 1–92.
- Orosz SE. Anatomy of the urogenital system. In: Altman RB, Clubb SL, Dorrestein GM, Quesenberry K, Hrsg. Avian medicine and surgery. Philadelphia: Saunders; 1997. p. 614–22.
- Orsi AM, Vicentini CA, Dias SM, Michelin SC, Viotto MJ. Histochemical and structural characteristics of the testis of the vampire bat (*Desmodus rotundus rotundus*, Geoffrey, 1810). Rev Bras Biol. 1990;50(1):221–8.
- Orth JM. The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. Endocrinology. 1984;115(4):1248–55.
- Ozegbe PC, Aire TA, Deokar MS. The cytoskeletal proteins in the contractile tissues of the testis and its excurrent ducts of the passerine bird, Masked Weaver (*Ploceus velatus*). Tissue Cell. 2012;44(1):22–31.
- Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. Endocr Rev. 2004;25(6):947–70.
- Pearl CA, Mason H, Roser JF. Immunolocalization of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and androgen receptor in the pre-, peri- and post-pubertal stallion testis. Anim Reprod Sci. 2011;125(1-4):103–11.
- Peixoto JV, Paula TAR, Balarini MK, Matta SLP, Santos JAD, Lima CB et al. Morphofunctional Evaluation of the Testicle and the Spermatogenic Process of Adult White-Eyed Parakeets (*Aratinga leucophthalma* MULLER, 1776) During the Different Seasons of the Year. Anat Histol Embryol. 2012;41(4):248–55.
- Pelletier G, Labrie C, Labrie F. Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. J Endocrinol. 2000;165(2):359–70.

- Pelletier G, Luu-The V, Li S, Ren L, Labrie F. Localization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 mRNA in mouse tissues. *J Mol Endocrinol.* 2004;33(2):459–65.
- Penning TM. Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr Rev.* 1997;18(3):281–305.
- Pepper JW. The Behavioral Ecology of the Glossy Black-Cockatoo *Calyptorhynchus lathami halmaturinus*. [Ph.D. thesis]. Michigan: Univ. of Michigan; 1996.
- Pillai SB, Rockwell LC, Sherwood OD, Koos RD. Relaxin stimulates uterine edema via activation of estrogen receptors: blockade of its effects using ICI 182,780, a specific estrogen receptor antagonist. *Endocrinology.* 1999;140(5):2426–9.
- Pitcher TE, Dunn PO, Whittingham LA. Sperm competition and the evolution of testes size in birds. *J Evol Biol.* 2005;18(3):557–67.
- Pohl-Apel G. Sexuelle Ontogenese bei männlichen Wellensittichen *Melopsittacus undulatus*. *J Ornithol.* 1980;121(3):271-279.
- Pohl-Apel G, Sossinka R, Wyndham E. Gonadal Cycles of Wild Budgerigars, *Melopsittacus undulatus* (*Psittaciformes: Platycercidae*). *Aust J Zool.* 1982;30(5):791–7.
- Pollock CG, Orosz SE. Avian reproductive anatomy, physiology and endocrinology. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2002;5(3):441–74.
- Proszkowiec-Weglarz M, Rzasa J, Slomczynska M, Paczoska-Eliasiewicz H. Steroidogenic activity of chicken ovary during pause in egg laying. *Reprod Biol.* 2005;5(2):205–25.
- Purohit VD, Basrur PK, Bhatnagar MK. Histochemical localization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the testes of chicken-pheasant hybrids. *Histochem J.* 1977;9(3):293–9.
- Qian Y, Liu S, Guan Y, Pan H, Guan X, Qiu Z et al. Lgr4-mediated Wnt/beta-catenin signaling in peritubular myoid cells is essential for spermatogenesis. *Development.* 2013;140(8):1751–61.
- Reitemeier S, Hänse M, Hahn A, Schmidt V, Steinbach-Sobiraj K, Krautwald-Junghanns M et al. Evaluating the reproductive status of the male budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). *Gen Comp Endocrinol.* 2011;171(3):350–8.
- Reitemeier S, Hänse M, Hahn A, Schmidt V, Steinbach-Sobiraj K, Tätzner S et al. Antibody selection for immunocytochemical characterization of the male reproductive system in *Psittaciformes*. *Theriogenology.* 2013;80(6):597-608.

- Riters LV, Baillien M, Eens M, Pinxten R, Foidart A, Ball GF et al. Seasonal variation in androgen-metabolizing enzymes in the diencephalon and telencephalon of the male European starling (*Sturnus vulgaris*). *J Neuroendocrinol.* 2001;13(11):985–97.
- Robiller F. Papageien 1: Hygiene, Krankheiten, Brut und Aufzucht. Papageien Australiens, Ozeaniens und Südostasiens. Stuttgart: Ulmer; 2001.
- Rochester JR, Forstmeier W, Millam JR. Post-hatch oral estrogen in zebra finches (*Taeniopygia guttata*): is infertility due to disrupted testes morphology or reduced copulatory behavior? *Physiol Behav.* 2010;101(1):13–21.
- Rodríguez Castillo AM, Eberhard JR. Reproductive behavior of the Yellow-crowned Parrot (*Amazona ochrocephala*) in Western Panama. *Wilson J Ornithol.* 2006;118(2):225–36.
- Romero MM, Vila R, Fernandez-Lopez JA, Esteve M, Alemany M. Influence of oleoyl-estrone treatment on circulating testosterone. Role of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoenzymes. *J Physiol Pharmacol.* 2009;60(1):181–90.
- Ros AFH, Franco AMA, Grootuis TGG. Experience modulates both aromatase activity and the sensitivity of agonistic behaviour to testosterone in black-headed gulls. *Physiol Behav.* 2009;97(1):30–5.
- Rossato M, Nogara A, Merico M, Ferlin A, Foresta C. Identification of functional binding sites for progesterone in rat Leydig cell plasma membrane. *Steroids.* 1999;64(1-2):168–75.
- Rowley I, Collar NJ. *Psittacidae, Cacatuidae*. In: del Hoyo J, Elliot A, Sargatal J, Hrsg. *Handbook of the birds in the world, Vol. 4, Sandgrouse to Cuckoos*. Barcelona: Lynx Edicions; 1997. p. 246–477.
- Samour JH. The Reproductive Biology of the Budgerigar (*Melopsittacus undulatus*): Semen Preservation Techniques and Artificial Insemination Procedures. *J Avian Med Surg.* 2002;16(1):39–49.
- Samour JH, Moore HDM, Bailey IT, Watson PF. Annual testicular cycle in captive budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *J Zool.* 1987;212(3):465–73.
- Sasso-Cerri E, Faria FP de, Freymüller E, Miraglia SM. Testicular morphological changes during the seasonal reproductive cycle in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 2004;301(3):249–60.
- Scanes CG. Introduction to endocrinology: Pituitary gland. In: Sturkie PD, Whittow GC, Hrsg. *Sturkie's Avian Physiology*: Academic Press; 2000. p. 437–52.

- Scott DJ, Fu P, Shen P, Gundlach A, Layfield S, Riesewijk A et al. Characterization of the rat INSL3 receptor. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1041:13–6.
- Shanbhag BA, Sharp PJ. Immunocytochemical localization of androgen receptor in the comb, uropygial gland, testis, and epididymis in the domestic chicken. *Gen Comp Endocrinol.* 1996;101(1):76–82.
- Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill JD, Greenwald GS, Markert CL, Pfaff DW, Hrsg. *The physiology of reproduction.* 2. Aufl. New York: Raven Press; 1994. p. 1363–434.
- Sherwood OD. Relaxin. In: Knobil E, Neill JD, Greenwald GS, Markert CL, Pfaff DW, Hrsg. *The physiology of reproduction.* 2. Aufl. New York: Raven Press; 1994. p. 861–1009.
- Sibley CG, Ahlquist JE. *The phylogeny and classification of birds: a study in molecular evolution.* New Haven, Connecticut: Yale University Press; 1990.
- Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Varone G, Genazzani AR. Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Proceedings of the Third International Meeting on Rapid Responses to Steroid Hormones.* 2004;69(8–9):537–42.
- Smith GT, Brenowitz EA, Beecher MD, Wingfield JC. Seasonal changes in testosterone, neural attributes of song control nuclei, and song structure in wild songbirds. *J Neurosci.* 1997;17(15):6001–10.
- Smith MJ, Brereton JL. Annual gonadal and adrenal cycles in the Eastern Rosella, *Platycerus eximius* (*Psittaciformes: Platycercidae*). *Aust J Zool.* 1976;24(4):541–56.
- Soma KK, Alday NA, Hau M, Schlinger BA. Dehydroepiandrosterone metabolism by 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta5-Delta4 isomerase in adult zebra finch brain: sex difference and rapid effect of stress. *Endocrinology.* 2004;145(4):1668–77.
- Song D, Liu G, Luu-The V, Zhao D, Wang L, Zhang H et al. Expression of aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1, 7 and 12 in breast cancer. An immunocytochemical study. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006;101(2-3):136–44.
- Spoon TR, Millam JR, Owings DH. Behavioural compatibility, extrapair copulation and mate switching in a socially monogamous parrot. *Anim Behav.* 2007;73:815–24.
- Steinetz BG, Beach VL, Kroc RL. The physiology of relaxin in laboratory animals. In: Lloyd CW, Hrsg. *Recent progress in the endocrinology of reproduction. Proceedings of the conference held in Syracuse, New York; 1958 June 9-12.* New York, London: Academic Press; 1959. p. 389–427.

Steinetz BG, Beach VL, Tripp LV, DeFalco RJ. Reactions of antisera to porcine relaxin with relaxin-containing tissues of other species in vivo and in vitro. *Eur J Endocrinol.* 1964;47(3):371–84.

Suh A, Paus M, Kiefmann M, Churakov G, Franke FA, Brosius J et al. Mesozoic retroposons reveal parrots as the closest living relatives of passerine birds. *Nat Commun.* 2011;2:443.

Summers R, Bathgate R, Ivell R, Sanborn B, Sherwood D. Relaxin family peptide receptors. Last modified on 13/03/2013. IUPHAR database (IUPHAR-DB). 2013 (zitiert vom 4.6.2013) <<http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=60>>.

Taylor M. Endoscopic examination and biopsy techniques. In: Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR, Hrsg. *Avian medicine: Principles and application.* Lake Worth, Florida: Wingers Publishing; 1994. p. 327–54.

Tingari MD. On the structure of the epididymal region and ductus deferens of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J Anat.* 1971;109(3):423.

Tingari MD. Histochemical localization of 3- and 17-hydroxysteroid dehydrogenases in the male reproductive tract of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Histochem J.* 1973;5(1):57–65.

Tostes GD, Costa SF, Carvalho JP de, Costa WS, Sampaio FJB, Favorito LA. Structural analysis of testicular appendices in patients with cryptorchidism. *Int Braz J Urol.* 2013;39(2):240–7.

Trillmich F. Spatial Proximity and Mate-specific Behaviour in a Flock of Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*; Aves, *Psittacidae*). *Z Tierpsychol.* 1976;41(3):307–31.

Tsutsui K, Ishii S. Effects of follicle-stimulating hormone and testosterone on receptors of follicle-stimulating hormone in the testis of the immature Japanese quail. *Gen Comp Endocrinol.* 1978;36(2):297–305.

Tunca R, Toplu N, Kirkan S, Avci H, Aydogan A, Epikmen ET et al. Pathomorphological, immunohistochemical and bacteriological findings in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) naturally infected with *S. Gallinarum*. *Avian Pathol.* 2012;41(2):203–9.

Ukena K, Honda Y, Inai Y, Kohchi C, Lea RW, Tsutsui K. Expression and activity of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta5-Delta4-isomerase in different regions of the avian brain. *Brain Res.* 1999;818(2):536–42.

Ukena K, Honda Y, Lea RW, Tsutsui K. Developmental changes in progesterone biosynthesis and metabolism in the quail brain. *Brain Res.* 2001;898(1):190–4.

- United Nations. Milleniums-Entwicklungsziele Bericht 2010 (zitiert vom 8.7.2013):55-7, <<http://www.un.org/depts/german/millennium/MDG%20Report%202010%20German.pdf>>.
- United Nations. Milleniums-Entwicklungsziele Bericht 2013 (zitiert vom 8.7.2013):48, <[http://www.un.org/Depts/german/millennium/MDG%20Report%202013\\_german.pdf](http://www.un.org/Depts/german/millennium/MDG%20Report%202013_german.pdf)>.
- van den Brand JMA, Manvell R, Paul G, Kik MJL, Dorrestein GM. Reovirus infections associated with high mortality in *Psittaciformes* in The Netherlands. Avian Pathol. 2007;36(4):293–9.
- Voigt C, Ball GF, Balthazart J. Effects of sex steroids on aromatase mRNA expression in the male and female quail brain. Gen Comp Endocrinol. 2011;170(1):180–8.
- Vornberger W, Prins G, Musto NA, Suarez-Quian CA. Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. Endocrinology. 1994;134(5):2307–16.
- Wacker DW, Wingfield JC, Davis JE, Meddle SL. Seasonal changes in aromatase and androgen receptor, but not estrogen receptor mRNA expression in the brain of the free-living male song sparrow, *Melospiza melodia morphna*. J Comp Neurol. 2010;518(18):3819–35.
- Wagner A, Messe N, Bergmann M, Lekhkota O, Claus R. Effects of estradiol infusion in GnRH immunized boars on spermatogenesis. J Androl. 2006;27(6):880–9.
- Waibl H, Sinowatz F. Harn-und Geschlechtsapparat. In: Nickel R, Schummer A, Seiferle E, Hrsg. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band V, Anatomie der Vögel. 2. Aufl. Berlin, Hamburg: Parey; 1992. p. 234–61.
- Wajima Y, Furusawa T, Kawauchi S, Wakabayashi N, Nakabayashi O, Nishimori K et al. The cDNA cloning and transient expression of an ovary-specific 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase of chickens. Gene. 1999;233(1-2):75–82.
- Waterhouse DM. Parrots in a nutshell: The fossil record of *Psittaciformes* (Aves). Hist Biol. 2006;18(2):227–38.
- Weber MA, Groos S, Aumuller G, Konrad L. Post-natal development of the rat testis: steroid hormone receptor distribution and extracellular matrix deposition. Andrologia. 2002;34(1):41–54.
- Weihua Z, Saji S, Mäkinen S, Cheng G, Jensen EV, Warner M et al. Estrogen receptor (ER)  $\beta$ , a modulator of ER $\alpha$  in the uterus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(11):5936–41.

- White NE, Phillips MJ, Gilbert MTP, Alfaro-Núñez A, Willerslev E, Mawson PR et al. The evolutionary history of cockatoos (Aves: *Psittaciformes: Cacatuidae*). *Mol Phylogenet Evol.* 2011;59(3):615–22.
- Williams TD. Reproductive endocrinology of macaroni (*Eudyptes chrysolophus*) and gentoo (*Pygoscelis papua*) penguins. I. Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids and LH in breeding adults. *Gen Comp Endocrinol.* 1992;85(2):230–40.
- Wright TF, Schirtzinger EE, Matsumoto T, Eberhard JR, Graves GR, Sanchez JJ et al. A Multilocus Molecular Phylogeny of the Parrots (*Psittaciformes*): Support for a Gondwanan Origin during the Cretaceous. *Mol Biol Evol.* 2008;25(10):2141–56.
- Wüst R. Der Fonds für bedrohte Papageien – weltweiter Schutz freilebender Papageien. *Gefiederte Welt.* 2012;136(11):21-3.
- Yamamoto JT, Shields KM, Millam JR, Roudybush TE, Grau CR. Reproductive activity of force-paired cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). *Auk.* 1989:86–93.
- Young KA, Nelson RJ. Mediation of seasonal testicular regression by apoptosis. *Reproduction.* 2001;122(5):677–85.
- Zhai J, Lanclos KD, Abney TO. Estrogen receptor messenger ribonucleic acid changes during Leydig cell development. *Biol Reprod.* 1996;55(4):782–8.
- Zhang J, Ricketts SW, Tanner SJ. Antisperm antibodies in the semen of a stallion following testicular trauma. *Equine Vet J.* 1990;22(2):138–41.

---

## 8 ANHANG

### 8.1 Weitere Publikationen

#### Originalarbeiten

Hänse M, Krautwald-Junghanns ME, **Reitemeier S**, Schmidt V. Testicular Biopsies in Psittacine Birds (*Psittaciformes*): Impact of Endoscopy and Biopsy on Health, Testicular Morphology and Sperm Parameters. J Avian Med Surg. 2013;27(4):258-263.

Hänse M, Krautwald-Junghanns ME, **Reitemeier S**, Schmidt V. Testicular Biopsies in Psittacine Birds (*Psittaciformes*): Comparative Evaluation of the Testicular Reproductive Status via Adsppection, Histology, and Cytology. J Avian Med Surg. 2013;27(4):247-257.

Hahn A, **Reitemeier S**, Gottschalk J, Haense M, Schmidt V, Steinbach-Sobiraj K et al. Endocrinologic studies of male psittacine birds for the evaluation of their reproductive status. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere. 2011;39(4):249–57.

Hänse M, Schmidt V, **Schneider S**, DellaVolpe A, Krautwald-Junghanns M. Comparative Examination of Testicular Biopsy Samples and Influence on Semen Characteristics in Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*): Journal of Avian Medicine and Surgery. J Avian Med Surg 2008; 22(4):300–9.

#### Kongressbeiträge (Posterpräsentationen/ Vorträge):

Hänse M, **Reitemeier S**, Hahn A, Einspanier A, Krautwald-Junghanns, Schmidt V. Die Bestimmung des Reproduktionsstadiums männlicher Papageien mittels spermatologischer, endokrinologischer und hodenmorphologischer Parameter. 17. DVG-Tagung über Vogelkrankheiten, 2012 März 1-3, München.

**Reitemeier S**, Einspanier A. Histological and immunocytochemical characterization of the reproductive status in male budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). 3rd Autumn School, Current Concepts in Immunology, Dt. Gesellschaft für Immunologie, 2011 Okt 9-14, Bad Schandau.

Schmidt V, Hänse M, **Reitemeier S**, DellaVolpe A, Hahn A, Einspanier A, Krautwald-Junghanns ME. Fertility Assessment of Male Psittacine Birds. 10<sup>th</sup> Conference of the European Association of Avian Veterinarians, 2009 März 17-21, Antwerp, Belgium:131-132.

**Reitemeier S**, Haense M, Hahn A, Schmidt V, Krautwald-Junghanns ME, Einspanier A. Classification of different reproductive states by morphological studies on testes of the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). Abstr. 42. Jahrestagung der Fachgruppe Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, Leipzig 2009; *Reprod. Dom. Anim.* (2009) 44 (Suppl. 1):81. (POSTER)

Schmidt V, Hänse M, **Schneider S**, DellaVolpe A, Einspanier A, Krautwald-Junghanns ME. Assessment of the reproductive status in male parrots. 29<sup>th</sup> Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians 2008 Aug 9-14, Savannah, Georgia, USA:283-8.

Schmidt V, **Schneider S**, Sohr M, Haense M, Hahn A, DellaVolpe A, Einspanier A, Krautwald-Junghanns ME. Fertility assessment in male psittacine birds. Annual Meeting of the European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians 2008, Leipzig:233-4.

Hänse M, Schmidt V, **Schneider S**, Steinbach-Sobiraj K, Krautwald-Junghanns ME. Testicular Biopsies in Psittacine birds – comparison between histology and cytology. 6<sup>th</sup> International Zoo and Wildlife Research Conference on Behaviour, Physiology and Genetics, 2007 Okt 7-10, Berlin 2007:99. (POSTER)

**Schneider S**, Hahn A, Hänse M, Schmidt V, Krautwald-Junghanns ME, Einspanier A. Assessment of the reproductive status in male parrots. 6<sup>th</sup> International Zoo and Wildlife Research Conference on Behaviour, Physiology and Genetics, 2007 Okt 7-10, Berlin:192-3. (POSTER)

Schmidt V, **Schneider S**, Hänse M, Hahn A, Steinbach-Sobiraj K, Einspanier A, Krautwald-Junghanns ME. Untersuchungen zum Reproduktionsstatus, zur Spermagewinnung sowie – analyse bei Vögeln der Ordnung Psittaciformes. 11. Tagung des Fonds für bedrohte Papageien, 2007 Okt 6, Leipzig.

Haense M, Schmidt V, **Schneider S**, Krautwald-Junghanns ME. Testicular Biopsies in Psittacine Birds – Comparison between Histology and Cytology. 9<sup>th</sup> Conference of the European Association of Avian Veterinarians, 2007 März 27-31, Zürich, Schweiz: 350-6.

Hänse M, Schmidt V, **Schneider S**, Steinbach-Sobiraj K, Krautwald-Junghanns ME. Testicular biopsies in psittacine birds: comparison between histology and cytology. Abstr. 40. Jahrestagung der Fachgruppe Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, Berlin 2007; *Reprod. Dom. Anim.* (2007) 42 (Suppl. 1):24. (POSTER)

## DANKSAGUNG

---

### DANKSAGUNG

Zuerst gilt mein besonderer Dank meinen beiden Betreuerinnen Frau Prof. Dr. Almut Einspanier und Frau Prof. Dr. Maria-Elisabeth Krautwald-Junghans für ihre stetige Unterstützung während des Projektes, die kritische sowie konstruktive Durchsicht des Manuskriptes und die unermüdliche Motivation, trotz familiär bedingter Unterbrechungen das Ziel nie aus den Augen zu verlieren.

Ich möchte außerdem allen Mitarbeitern sowohl der Klinik für Vögel und Reptilien als auch des Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institutes für die gute Zusammenarbeit und das kollegiale Miteinander meinen Dank aussprechen.

Besonders hervorzuheben sind an dieser Stelle:

- Herr Dr. Volker Schmidt für die kompetente Einführung in die Sektionstechniken und sein Engagement bei der Probenentnahme und deren histologischer Beurteilung.
- Frau Dr. Maria Hänse, die mit mir gemeinsam alle Hürden des Projektes konsequent gemeistert und mit ihren Adлераugen selbst den kleinsten Fehler meiner verfassten Texte aufgespürt hat.
- Frau Katrin Steinbach-Sobiraj für ihre großartige berufliche und vor allem private Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.
- Frau Marion Sohr für ihre tatkräftige und geduldige Einweisung in die immunzytochemischen Techniken.
- Frau Susanne Tätzner für ihre fleißige Mithilfe bei den immunzytochemischen Färbungen und die netten Gespräche am Mikroskop.
- Frau Dr. Friederike Kühnel für die hilfreichen Tipps bei der Erstellung des Manuskriptes und dessen aufmerksame Durchsicht.
- Frau Dr. Corinna Arnold für den regen Informationsfluss bezüglich formeller Fragen.
- Frau Anne Weissmann für ihre geduldige Unterstützung bei der Arbeit mit Statistik- und Literaturprogrammen sowie alle angeregten Diskussionen diverser Entscheidungsfragen.

Ich danke Wellensittich „Lui“, der entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

Meinen Eltern und Geschwistern bin ich überaus dankbar, dass sie mich während des Studiums immer unterstützt und motiviert haben. Meiner Schwägerin, Frau Dr. Vera Schneider, danke ich für ihre wertvollen Tipps bei der Beantragung von Fördermitteln.

## DANKSAGUNG

---

Mein größter Dank gilt meinem Mann für seine unendliche Geduld, Liebe und fachlich kompetente Unterstützung während meines Studiums und der Promotion. Besonders danke ich auch meinen beiden Kindern, die gerade an den Wochenenden der letzten Monate oftmals „nur“ mit Papa vorlieb nehmen mussten und es ihrer Mama trotzdem nicht übel genommen haben.

Für die Finanzierung des Projektes danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG El 333/12-2 und KR 1732-5-1). Den Wiedereinstieg in meine wissenschaftliche Tätigkeit ermöglichten mir die Universität Leipzig und die Sächsische Aufbaubank (Europäischer Sozialfonds ESF, Projektnummer 100098233).



Gefördert aus Mitteln  
der Europäischen Union

Europa fördert Sachsen.



Europäischer Sozialfonds