

# Hormonalna aktywność tarczycy w okresie zimowego anestrus oraz wybranym cyklu płciowym sezonu rozrodczego klaczy

JÓZEF NIEZGODA, MAREK TISCHNER\*, DANUTA WROŃSKA-FORTUNA

Katedra Fizjologii Zwierząt, \*Katedra Rozrodu Zwierząt Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt AR, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

Niezgoda J., Tischner M. Jr., Wrońska-Fortuna D.

## Hormonal activity of the thyroid gland in mares during winter anestrus and selected sexual cycles in the reproductive season

### Summary

Hormonal activity of the thyroid gland was measured in mares during winter anestrus, as well as at the luteal and follicular phases of the sexual cycle. The length of the winter anestrus and phases of the sexual cycle were observed according to sexual behavior (flirting with a stallion). The ovaries were checked by palpation and with use of USG per rectum. Estradiol and progesterone concentrations in blood plasma were also determined. Thyroid activity was defined by thyroxine ( $T_4$ ) and triiodothyronine ( $T_3$ ) levels in blood plasma. Steroid and thyroid hormones were determined using radioimmunological methods. The highest  $T_4$  concentrations were found at the beginning and end of winter anestrus, while those of  $T_3$  were the highest only at the time of anestrus. The plasma concentration of thyroid hormones was stable during the whole sexual cycle. It must be pointed out that it resembled the levels observed during the previous time of anestrus. The highest concentration of thyroid hormones which occurred at the end of winter anestrus and during the sexual cycle indicates their influence on the mechanisms controlling the seasonality of reproduction in the mare.

**Keywords:** Thyroid hormones, winter anestrus, sexual cycle

Wpływ hormonów tarczycowych na wzrost i rozwój somatyczny i psychiczny zwierząt przejawia się bezpośrednim oddziaływaniem na metabolizm całego organizmu, co znajduje odzwierciedlenie w czynności jak i współdziałaniu poszczególnych narządów i układów (26). Wykazano, że tyroksyna ( $T_4$ ) i trójjodotyronina ( $T_3$ ) wpływają także na układ rozrodczy oraz mechanizmy regulujące jego czynności (1, 6, 12). Stwierdzono udział jodotyronin w występowaniu sezonów rozrodczych (7, 11, 19, 25). Sezonowość rozrodcza związana jest z długością dnia świetlnego, sekrecją melatoniny i jej wpływem na aktywność układu podwzgórzowo-przysadkowo-gonadowego (4, 5, 8-10, 16, 17, 22, 23, 28). Wykazano bezpośredni wpływ hormonów tarczycowych na sekrecję melatoniny i podwzgórzowej gonadoliberyny (Gn RH; 1, 35). Powoduje to zmiany uwalniania przysadkowych gonadotropin FSH i LH, które są odpowiedzialne za wzrost i dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych, owulację i powstanie ciała żółtego oraz syntezę i sekrecję hormonów steroidowych – estrogenów i gestagenów (14, 18, 29, 30).

Rolę hormonów tarczycowych w występowaniu sezonów rozrodczych u ssaków wykazano głównie u owiec (2, 16, 19, 20, 31, 34, 35). U klaczy jest ona

stosunkowo mało poznana. W dotychczasowych badaniach zaobserwowano, że tyreektomia nie zmienia aktywności płciowej klaczy w sezonie rozrodczym (15) oraz czasu rozpoczęcia zimowego *anestrus* (24). Stwierdzono natomiast, że u klaczy wykazujących w zimie cykle płciowe stężenie  $T_4$  jest wyższe w porównaniu do klaczy o zimowym *anestrus* (7, 11). Na tej podstawie oraz na stosowaniu w praktyce podawania  $T_4$  w celu skrócenia zimowego *anestrus* Fitzgerald i Davison (7) uważają, że hormony tarczycowe spełniają bliżej nieokreśloną rolę w przejściu klaczy do sezonu rozrodczego.

Celem badań było określenie stanu klinicznego i aktywności hormonalnej jajników i tarczycy klaczy w zimowym *anestrus*, a także w fazie lutealnej i pęcherzykowej cyklu płciowego.

### Material i metody

Badania przeprowadzono na klaczach rasy konik polski w wieku od 7 do 17 lat. Zwierzęta utrzymywane były w tych samych warunkach pomieszczeniowych (stajnia, całodzienny wybieg) i naturalnym dniu świetlnym. Klacze jednakowo żywiono – zimą dostawały siano łąkowe oraz owies i marchew, latem przebywały na pastwisku, ze swobodnym dostępem od wody.

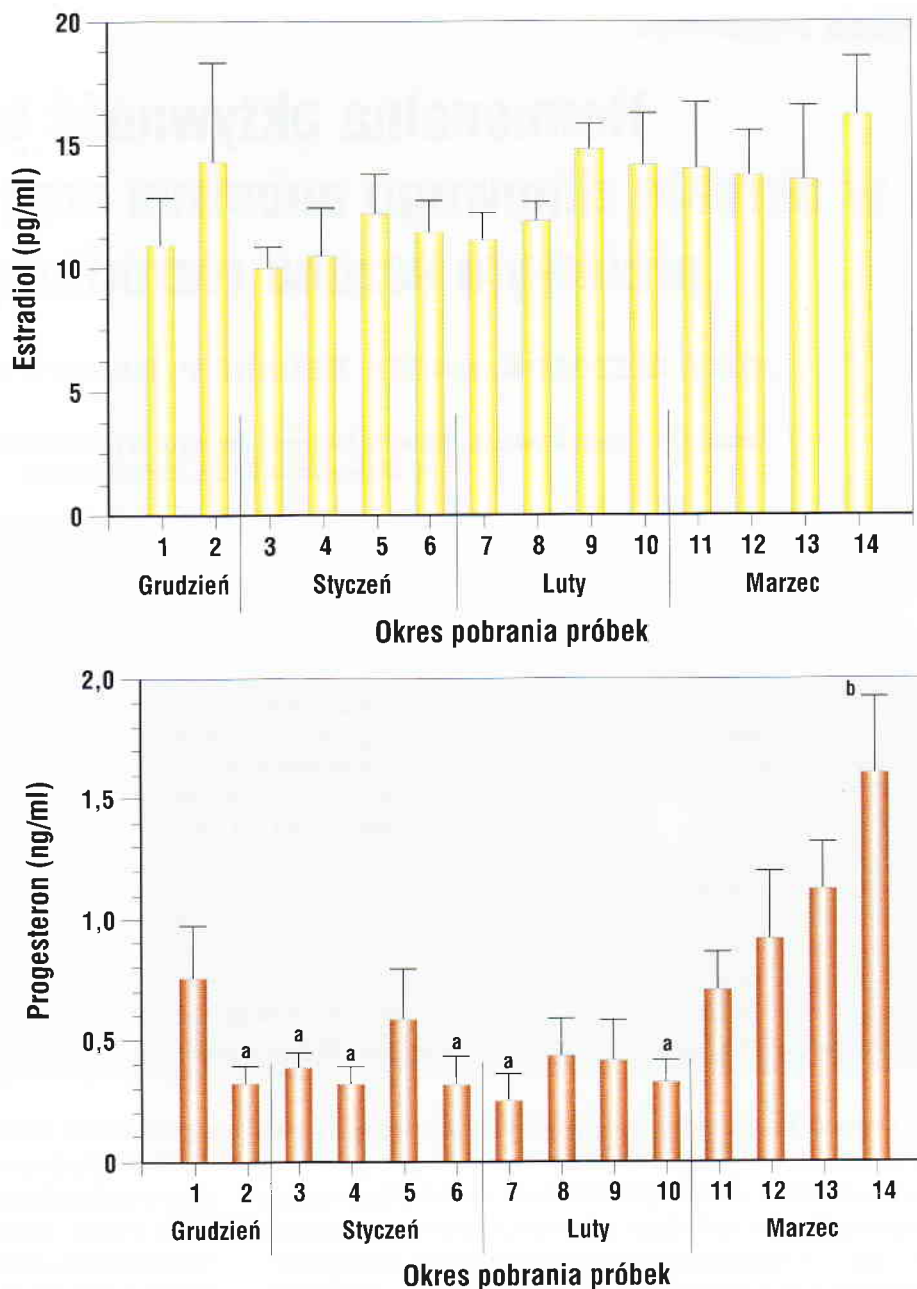
W okresie zimowego *anestrus* i sezonie rozrodczym badania przeprowadzono odpowiednio na 7 i 5 tych samych klaczach. Przez cały okres doświadczenia klacze były systematycznie badane w kierunku występowania zewnętrznych objawów rui (próby z ogierem) oraz kontrolowano stan jajników manualnie i ultrasonograficznie (aparatem Ultra-Vission z głowicą 5 MHz) przez prostnicę. Krew do oznaczeń hormonów steroidowych (estradiolu i progesteronu) oraz hormonów tarczycowych ( $T_4$  i  $T_3$ ) pobierano z żyły szyjnej zewnętrznej do probówek z heparyną. Odwirowane osocze przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania oznaczeń. W okresie zimowego *anestrus* wykonano 14 pobrań krwi co tydzień od 22 grudnia 1998 do 23 marca 1999 r. W sezonie rozrodczym badano cykl płciowy w miesiącu sierpniu 1999 r., pobierając krew odpowiednio w 11 i 19 dniu fazy lutealnej i pęcherzykowej.

Stężenie hormonów płciowych estradiolu i progesteronu oznaczano metodami radioimmunologicznymi (RIA) przy pomocy zestawów firmy „Spectria” Finlandia, a do oznaczenia stężenia hormonów tarczycowych –  $T_4$  i  $T_3$  – użyto zestawów firmy „Polatom” Otwock-Świerk. Czulość metody dla estradiolu wynosiła  $5,45\text{ pg/ml}$ , średni odzysk  $99,5\%$ , błąd międzyseryjny i wewnątrzseryjny odpowiednio  $5,7\%$  i  $4,9\%$ , wiązanie krzyżowe estradiol  $100\%$ , estron  $0,97\%$ , estriol  $0,44\%$ . Czulość metody dla progesteronu wynosiła  $0,06\text{ ng/ml}$ , średni odzysk  $98,2\%$ , błąd międzyseryjny i wewnątrzseryjny odpowiednio  $4,3\%$  i  $4,9\%$ , wiązania krzyżowe progesteron  $100\%$ , pregnanolon  $3,9\%$ , kortykosteron  $0,9\%$ .

Do określenia hormonów tarczycowych użyto zestawów  $T_4$ -RIA-PROP w zakresie  $0\text{--}386\text{ nmol/l}$  przy czulości  $6,43\text{ nmol/l}$  oraz RIA- $T_3$  w zakresie  $0\text{--}7,7\text{ nmol/l}$  przy czulości  $0,15\text{ nmol/l}$ . Błąd wewnątrzseryjny wynosił odpowiednio  $6,38\%$  i  $5,92\%$ . Ocenę statystyczną wyników wykonano jednoczynnikową analizą wariancji, testem istotności Duncana oraz testem t-Studenta (21).

### Wyniki i omówienie

Długość zimowego *anestrus* u klaczy wynosiła  $139,1 \pm 4,2$  dni. W tym czasie klacze nie wykazywały behawioralnych objawów rui, a badania palpacyjne i ultrasonograficzne jajników wykazały, że były one małe i twarde. Podczas tego sezonu pojawiły się małe pęcherzyki, których średnica nie przekraczała  $15\text{--}20\text{ mm}$ . Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami



Ryc. 1. Zmiany stężenia estradiolu i progesteronu w osoczu krwi klaczy w okresie zimowego *anestrus* ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

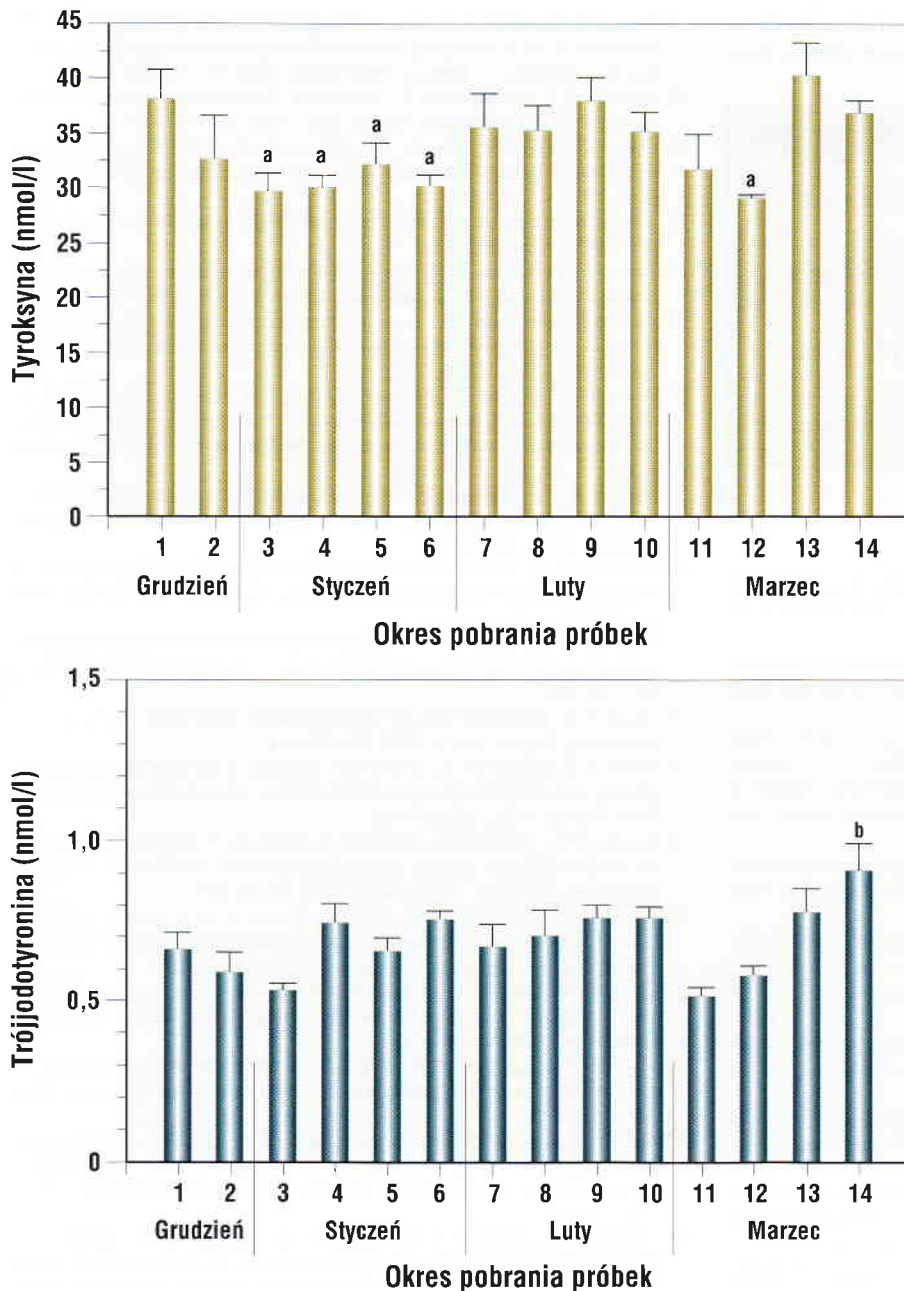
Objaśnienia: a –  $p \leq 0,05\text{--}0,01$  w stosunku do pozostałych pobrań; b –  $p \leq 0,05\text{--}0,01$  od 1 do 11 pobrania

przeprowadzonymi na klaczach rasy konik polski (32, 33).

Stężenie estradiolu w osoczu krwi wykazywało tendencję wzrostową w końcowym okresie zimowego *anestrus* (ryc. 1). W grudniu wynosiło  $10,8 \pm 1,9$  a w marcu  $16,03 \pm 2,4\text{ pg/ml}$  i nie było statystycznie istotne. Wzrost ten był prawdopodobnie wynikiem pojawienia się pęcherzyków o średnicy przekraczającej  $20\text{ mm}$ , a szczególnie w marcu, co może wskazywać na rozpoczęcie przejścia do sezonu rozrodczego. Ruja u 6 klaczy wystąpiła do 15 kwietnia.

Początkowe stężenie progesteronu wynosiło  $0,75 \pm 0,2$ , a następnie obniżyło się istotnie ( $p \leq 0,05$ ) do najniższego poziomu  $0,24 \pm 0,04\text{ ng/ml}$  po 7 tygodniach. Maksymalny wzrost progesteronu obserwowano





Ryc. 2. Zmiany stężenia tyroksyny i tójiodotyroniny w osoczu krwi kłacz w okresie zimowego *anestrus* ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

Objaśnienia: a –  $p \leq 0,05$  w stosunku do 1 pobrania; b –  $p \leq 0,05$  w stosunku do 1, 2, 3, 11 i 12 pobrania

no w marcu, kiedy jego poziom przekroczył wartości 1,0 ng/ml przyjmowany jako graniczny dla kłacz w zimowym *anestrus* (18) i wynosił odpowiednio  $1,1 \pm 0,2$  i  $1,61 \pm 0,3$  ng/ml. Ostatnia wartość była statystycznie wyższa od stwierdzonych od grudnia do początku marca (ryc. 1). Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi badaniami wielu autorów i potwierdzają, że przejście do okresu zimowego *anestrus*, jego trwanie i zakończenie są ściśle związane z aktywnością układu podwzgórzowo-przysadkowo-jajnikowego (3, 18, 27, 33).

Przeprowadzone badania wykazały, że na początku okresu zimowego *anestrus* stężenie  $T_4$  był wyższe –  $38,0 \pm 7,6$  nmol/l, a w miarę pogłębiania się tego okresu wykazywało tendencję do spadku. Po osiągnięciu istot-

nie niższych wartości w styczniu rozpoczął się wzrost stężenia  $T_4$  do poziomów obserwowanych w początkowej fazie *anestrus*. Stężenie  $T_3$  nie zmieniało się istotnie od grudnia do marca i wahało się od  $0,66 \pm 0,05$  do  $0,75 \pm 0,04$  nmol/l (ryc. 2). Wartość w ostatnich pobraniach (23 marzec) wynosiła  $0,91 \pm 0,1$  nmol/l i była istotnie wyższa od stwierdzonych na przełomie grudnia i stycznia oraz na początku marca. Huszenicza i wsp. (11) sugerują, że wzrost ten następuje na skutek konwersji  $T_4$  do  $T_3$ . Znamionować ona może końcową fazę zimowego *anestrus*. Potwierdzają to dane, w których podawanie egzogennej tyroksyny skracało zimowe *anestrus* (7).

Dla porównania uzyskanych wyników przeprowadzono także badania w sezonie rozrodczym, wybierając cykl płciowy w miesiącu sierpniu. W miesiącu tym Tischner i Wandas (32) wykazali rozpoczęcie wydłużania się długości cyklu płciowego poprzedzającego zimowe *anestrus* u kłacz rasy konik polski. Badania behawioralne oraz palpacyjne i ultrasonograficzne jajników wykazały w tym czasie prawidłowy przebieg cyklu. Długość cyklu wynosiła 21-22 dni, czas trwania fazy lutealnej 16-17, a pęcherzykowej 4-5 dni. Wyniki te nie odbiegały od norm podanych przez Tischnera i Wandasa (32) oraz Tischnera i wsp. (33). Stężenie hormonów steroidowych estradiolu i progesteronu (tab. 1) wykazywało prawidłowe wartości dla odpowiedniej fazy cyklu płciowego (33). Stężenie hormonów tarczycowych nie zmieniało się w fazach cyklu (tab. 1). Poziomy stężenie jodo-

tyronin odpowiadały wartościom stwierdzonym w końcowym okresie zimowego *anestrus*. Brak zmian aktywności tarczycy w cyklu płciowym u kłacz wykazali także Kelly i wsp. (12). Wynik ten wskazuje, że fizjologicznie wyższy poziom hormonów tarczycowych wpływa na występowanie cykli zarówno w wiosenno-letnim sezonie rozrodczym, co wykazano w niniejszych badaniach, i w sezonie jesienno-zimowym w przypadku występowania cykli płciowych (7, 11).

W podsumowaniu można stwierdzić, że wyższe stężenie hormonów tarczycowych  $T_4$ , a szczególnie  $T_4$  w osoczu krwi występuje w końcowym okresie zimowego *anestrus* oraz w sezonie rozrodczym. Wyniki te sugerują możliwość udziału tych hormonów w regulacji sezonów rozrodczych u kłacz.

**Tab. 1. Stężenie hormonów steroidowych i tarczycowych w osoczu krwi kłaczy w wybranym cyklu płciowym sezonu rozrodczego ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )**

Hormon	Faza lutealna	Faza pęcherzykowa
Estradiol pg/ml	35,3 ± 3,1	52,8 ± 4,0*
Progesteron ng/ml	8,8 ± 1,1	0,2 ± 0,01**
Tyrosyna nmol/l	32,3 ± 4,5	28,8 ± 1,3
Trójiodotyronina nmol/l	0,87 ± 0,1	1,2 ± 0,2

Objaśnienia: \*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01

### Piśmiennictwo

- Dahl G. E., Evans N. P., Moenter S. M., Karsch F. J.: The thyroid gland is required for reproductive neuroendocrine responses to photoperiod in the ewe. *Endocrinology* 1994, 135, 10-15.
- Dahl G. E., Evans N. P., Thrun L. A., Karsch F. J.: Thyroxine is permissive to seasonal transition in reproductive neuroendocrine activity in the ewe. *Biol. Reprod.* 1995, 52, 690-696.
- Davis S. D., Sharp D. C., Grubbaugh W. R.: Stimulation of LH by LHRH analogs in anestrus pony mares. *Biol. Reprod. Suppl.* 1, 1986, 34, 121 (Abstr.).
- Davison L. A., McManus C. J., Fitzgerald B. P.: Gonadotropin response to naloxone in the mare: effect of time of year and reproductive status. *Biol. Reprod.* 1996, 54, (S1), Abstr. 204.
- Fitzgerald B. P., Schmidt M. J.: Absence of an association between melatonin and reproductive activity in mares during the nonbreeding season. *Biol. Reprod. Mono.* 1995, 1, 425-434.
- Fitzgerald B. P., Davison L. A.: Comparison of the effects of N-methyl-DL-aspartic acid on gonadotropin and prolactin secretion in anestrus mares and mares exhibiting estrous cycles during anestrus. *Biol. Reprod.* 1997, 57, 36-42.
- Fitzgerald B. P., Davison L. A.: Thyroxine concentrations are elevated in mares which continue to exhibit estrous cycles during the nonbreeding season. *J. Equine Vet. Sci.* 1998, 18, 48-51.
- Guillaume D., Arnaud G., Camillo F., Duchamp G., Palmer E.: Effect of melatonin implants on reproductive status of mares. *Biol. Reprod. Mono.* 1995, 1, 339-346.
- Guillaume D., Duchamp G., Palmer E.: 35 jours longs suffisent pour avancer et établir la cyclicité des juments en inactivité hivernale. 22<sup>ème</sup> journée de la recherche équine, Institut du Cheval, Paris, 28.02.1996, s. 2-18.
- Hart P. J., Squires E. L., Imel K. J., Nett T. M.: Seasonal variation in hypothalamic content of gonadotropin releasing hormone (GnRH), pituitary receptors for GnRH and pituitary content of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in the mare. *Biol. Reprod.* 1984, 30, 1055-1062.
- Huszenicza G., Nagy P., Juhász J., Kóródi P., Kulcsár M., Reizigél J., Guillaume D., Rudas P., Solti L.: Relationship between thyroid function and seasonal reproductive activity in mares. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 2000, 56, 163-172.
- Kelley S. T., Oehme F. W., Brandt G. W.: Measurement of thyroid gland function during the estrous cycle of nine mares. *Am. J. Vet. Res.* 1974, 35, 657-660.
- Kilmer D. M., Sharp D. C., Berglund L. A., Grubbaugh W., McDowell K. J., Peck L. S.: Melatonin rhythms in pony mares and foals. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1982, 32, 303-307.
- King S. S., Nequin L. G., Drake S., Hebner T. S., Roser J. F., Evans J. W.: Progesterone levels correlate with impending anestrus in the mare. *J. Equine Vet. Sci.* 1988, 8, 109-111.
- Lowe J. E., Foote R. H., Baldwin B. H., Hillman R. B., Kallfelz F. A.: Reproductive patterns in cyclic and pregnant thyroidectomized mares. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1987, 35, 281-288.
- Moenter S. M., Woodfill C. J., Karsch F. J. I.: Role of the thyroid gland in seasonal reproduction: thyroidectomy blocks seasonal suppression of reproductive neuroendocrine activity in ewes. *Endocrinology* 1991, 128, 1337-1344.
- Nagy P., Huszenicza G., Juhász J., Solti L., Kulcsár M.: Diagnostic problems associated with ovarian activity in barren and postpartum mares early in the breeding season. *Reprod. Dom. Anim.* 1998, 33, 187-192.
- Nequin L. G., King S. S., Roser J. F., Soderstrom B. L., Carnevale E. M., Neumann K. R.: Uncoupling of the equine reproductive axes during transition into anestrus. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 2000, 56, 153-161.
- Nicholls T. J., Goldsmith A. R., Dawson A.: Photorefractoriness in birds and comparison with mammals. *Physiol. Rev.* 1988, 68, 133-176.
- O'Callaghan D., Wendling A., Karsch F. J., Roche J. F.: Effect of exogenous thyroxine on timing of seasonal reproductive transitions in ewes. *Biol. Reprod.* 1993, 49, 311-315.
- Oktaba W.: Elementy statystyki matematycznej i metodyka doświadczalnictwa. PWN, Warszawa 1976.
- Palmer E., Driancourt M. A.: Some interactions of season of foaling, photoperiod and ovarian activity in the equine. *Livest. Prod. Sci.* 1983, 10, 197-210.
- Palmer E., Guillaume D.: Some mechanisms involved in the response of mares to photoperiodic stimulation of reproductive activity. *Reprod. Dom. Anim.* 1998, 33, 205-208.
- Porter M. B., Cleaver B., Robinson G., Peltier M., Shearer L. C., Dahl G. E., Sharp D. C.: A comparative study examining the role of the thyroid in seasonal reproduction in pony mares and ewes. *Biol. Reprod.* 1995, 52, (S1), Abstr. 312.
- Reinert B. D., Wilson F. E.: The thyroid and the hypothalamus-pituitary-ovarian axis in American Tree Sparrows (*Spizella arborea*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 1996, 103, 60-70.
- Schwartz H. L.: Effect of thyroid hormone on growth and development. *W Molecular Basis of Thyroid Hormone Action.* Academic Press, London 1983, s. 413-444.
- Seamans K. W., Sharp D. C.: Changes in equine follicular aromatase activity during the transition from winter anestrus. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1982, 32, 225-233.
- Sharp D. C.: Transition into the breeding season: clues to the mechanisms of seasonality. *Equine Vet. J.* 1988, 20, 159-161.
- Silvia P. J., Squires E. L., Nett T. M.: Changes in the hypothalamus-hypophyseal axis of mares associated with seasonal reproductive recrudescence. *Biol. Reprod.* 1986, 35, 897-905.
- Snyder D. A., Turner D. D., Miller K. J., Garcia M. C., Ginther O. J.: Follicular and gonadotropin changes during transition from ovulatory to anovulatory seasons. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1979, 27, 95-101.
- Thrun L. A., Dahl G. E., Evans N. P., Karsch F. J.: A critical period for thyroid hormone action on seasonal changes in reproductive neuroendocrine function in the ewe. *Endocrinology* 1997, 138, 3402-3409.
- Tischner M., Wandas A.: Evaluation of the seasonal reproductive activity of Polish pony and heavy-type mares. *Inter. Congr. Anim. Reprod. AI Urbano.* Champaign, 1984, 2, 153-156.
- Tischner M., Niezgodą J., Tischner M.: Studies on the effect of massage on the ovaries on the reproductive activity of the mare. *Theriogenology* 1996, 45, 1457-1462.
- Webster J. R., Moenter S. M., Woodfill C. J. I., Karsch F. J.: Role of the thyroid gland in seasonal reproduction. II. Thyroxine allows a season-specific suppression of gonadotropin secretion in sheep. *Endocrinology* 1991a, 129, 176-183.
- Webster J. R., Moenter S. M., Barrell G. K., Lehman M. N., Karsch F. J.: Role of the thyroid gland in seasonal reproduction. III. Thyroidectomy blocks seasonal suppression of gonadotropin-releasing hormone secretion in sheep. *Endocrinology* 1991b, 129, 1635-1643.

Adres autora: prof. dr hab. Józef Niezgodą, ul. Armii Krajowej 87/16, 30-150 Kraków

### MADSEN L. W., BOYE M., JENSEN T. K., SVEN-SMARK B.: Wykrycie *in situ Actinobacillus pleuropneumoniae* w wysiękowym zapaleniu opon i zapaleniu nerek. (*Actinobacillus pleuropneumoniae* demonstrated *in situ* in exudative meningitis and nephritis). *Vet. Rec.* 149, 746-747, 2001 (24)

Przebadano bakteriologicznie i histopatologicznie tkanki padłego nagle przebiegu rasy mieszanej w wieku 10 tyg. życia. Na czoło zmian sekcyjnych wysuwało się chroniczne włóknikowe zapalenie opłucnej, zmartwiające zapalenie płuc, któremu towarzyszyło tworzenie „martwiaków”, zmniejszenie opon mózgowych, powiększenie komór bocznych mózgu, ropne wielogniskowe zapalenie mięszu nerek z zatorami i martwicą naczyń krwionośnych. Ze zmian w płucach oraz z płynu wypełniającego komory boczne mózgu wyizolowane *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Zarazek ten zidentyfikowano metodą hybrydyzacji *in situ* w płynie mózgowo-rdzeniowym, w zmianach chorobowych w nerkach i płucach. Pierwotnym ogniskiem zakażenia były najprawdopodobniej płuca, skąd infekcja rozprzestrzeniła się drogą hematogenną na opony mózgowie i nerki.