

Określanie poziomu estrogenów i gestagenów w kale jako alternatywna metoda monitorowania procesów rozrodczych u zwierząt

AGNIESZKA SKOLIMOWSKA, JACEK MAŁECKI-TEPICHT, TOMASZ JANOWSKI

Katedra Położnictwa i Patologii Rozrodu Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UW-M, ul. Oczapowskiego 14, 10-719 Olsztyn

Skolimowska A., MałECKI-Tepicht J., Janowski T.

Measuring the level of faecal sex steroids as an alternative method of monitoring reproduction functions in animals

Summary

Monitoring the reproductive status of a variety of mammalian species through faecal estrogens and gestagens is a relatively recent development. Measuring the concentration of faecal steroid hormones has some advantages. It is a non-invasive and straightforward method of collection, not requiring any conservation, based on only one faecal sample with easy access to analytical tests (RIA, EIA). This technique has been used frequently to diagnose pregnancy, monitor miscarriages, ovarian activity, corpus luteum function as well as to diagnose cryptorchidism and determine the reproductive season in an ever expanding list of farm species, free-ranging and zoo animals. The article also describes the physiological conditions of this method as well as the practical aspects of its use.

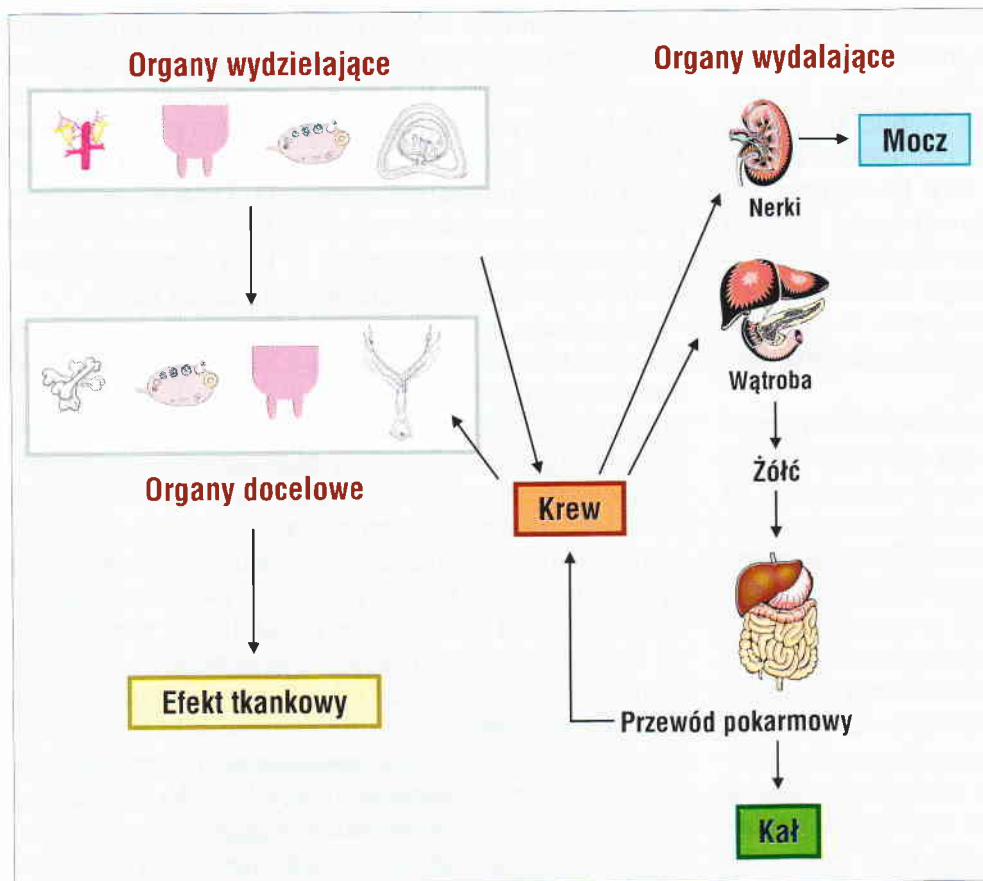
Keywords: reproduction, faeces, sex steroids

Podstawowymi metodami kontrolowania procesów rozrodczych u zwierząt są obserwacje i badania kliniczne (8). Określenie poziomu hormonów sterydowych w kale stanowi nową alternatywę monitorowania procesów rozrodczych u zwierząt (2, 23). Zaletą tej metody jest łatwość pobierania prób oraz całkowita nieinwazyjność. Umożliwia to jej szerokie zastosowanie nie tylko u zwierząt udomowionych (2), ale także pozwala na określenie poziomów hormonów sterydowych u wielu gatunków zwierząt przebywających w ogrodach zoologicznych lub żyjących dziko (5, 10, 11, 15, 24). U osobników tych, przy użyciu tradycyjnej metody, opartej na próbach krwi, istnieje konieczność stosowania sedacji, która często zagraża zdrowiu i życiu tych zwierząt (12, 23).

Głównymi organami produkującymi hormony sterydowe są jajniki, jądra, łożysko i nadnercza (1, 6, 7, 19, 25). Schemat biosyntezy płciowych hormonów sterydowych z uwzględnieniem tzw. szlaków Δ^5 lub Δ^4 przedstawia ryc. 1. Przemiany te są regulowane enzymatycznie, zaś do głównych enzymów biorących w nich udział należą: hydroksylazy, liazy, dehydrogenazy i izomerazy. Występowanie znacznych różnic narządowych i gatunkowych w produkcji poszczególnych hormonów sterydowych zależy od wyposażenia enzymatycznego organów różnych gatunków zwierząt (7, 19, 21, 25).

Hormony sterydowe są wydzielane do krwi i wraz z nią docierają do narządów i tkanek docelowych. Jako substancje hydrofobowe łączą się w osoczu ze specyficznymi białkami transportowymi cechującymi się wysokim powinowactwem i dużą pojemnością wiązania (1, 6, 7, 25). Powstałe w ten sposób kompleksy nie ulegają metabolizmowi i wydalaniu, pozostając we krwi w stanie dynamicznej równowagi. Stanowią one istniejącą w krwiobiegu pulę rezerwową, chroniącą ustrój przed nagłymi zmianami stężeń hormonów w osoczu krwi (1, 7). Biologiczną aktywność w organach docelowych wykazują jedynie niezwiązane z białkami hormony sterydowe, które łącząc się ze specyficznymi receptorami, wywołują efekty tkankowe (1, 7).

Inaktywacja ich nadmiaru ma natomiast miejsce w wielu organach, głównie jednak w wątrobie. Estrogeny są enzymatycznie sprzęgane z kwasem siarkowym i glukuronowym, w wyniku czego powstają siarczany i glukuroniany (1, 6, 7, 19, 23). Progesteron zaś jest metabolizowany do pregnanów, gestagenów cechujących się obecnością łańcuchów 5α i/lub 5β . Występowanie tych metabolitów u poszczególnych gatunków zwierząt jest zróżnicowane (4, 10, 19, 23, 24). Formy skoniugowane hormonów sterydowych (siarczany, glukuroniany), jak i pozostałe metabolity, są rozpuszczalne w wodzie i dlatego są szybko wydalane z moczem lub drogą żółci wraz z kałem (2, 19, 23). Powyższy opis



Ryc. 1. Schemat biosyntezy steroidowych hormonów płciowych z uwzględnieniem szlaków metabolicznych, tzw. Δ^4 i Δ^5

nie odnosi się do wszystkich szczegółów przemian hormonów steroidowych w ustroju, przedstawia jedynie jego główny zarys. Zasadniczy schemat metabolizmu hormonów steroidowych w organizmie przedstawia ryc. 2. Jak wynika z powyższego opisu, w kale znajdują się stosunkowo duże ilości estrogenów i gestagenów, co jest wynikiem ich przemian ustrojowych.

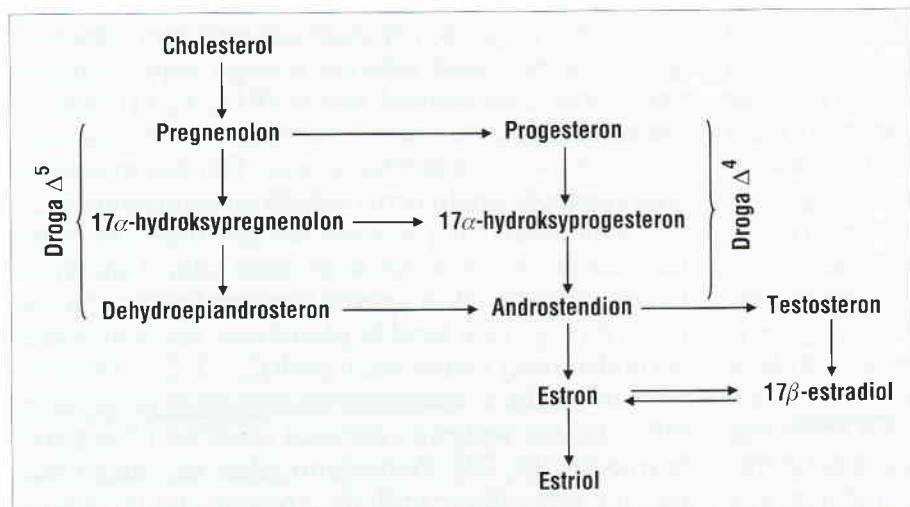
Badania wykonane u różnych gatunków zwierząt doświadczalnych z użyciem znakowanych steroidów płciowych, pozwoliły na dokładniejsze ustalenie ich metabolizmu, rodzaju powstających produktów, cza-

5 godzinach (15, 18, 23). W jelitach estrogeny będące w formie siarczanów lub glukuronianów ulegają dekonjugacji, co odbywa się pod wpływem flory bakteryjnej jelita grubego (2, 23). U większości gatunków zwierząt kał zawiera więc głównie wolne estrogeny. W ich skład wchodzi przede wszystkim estron oraz 17α - i 17β -estradiol. Rodzajowo odpowiada to w przybliżeniu ich zawartości w osoczu, jednakże koncentracja estrogenów wolnych w kale około tysiącrotnie przewyższa ich poziom we krwi (2, 13, 18, 20, 23). Natomiast w wyniku metabolizmu progesteronu, w kale

dominują opisane wyżej pregnandiony oraz mono- i dihydroksypregnanony. Obecność niezmetabolizowanego progesteronu w świetle jelit jest niewielka i leży na granicy wykrywalności (2, 23).

Określanie poziomu estrogenów w kale posiada duże znaczenie praktyczne. Głównie pozwala ono na diagnozowanie ciąży u tych gatunków zwierząt, których łożysko produkuje duże ilości tych hormonów. Należą do nich rodziny koniowatych, świńowatych i przeżuwaczy (2, 23).

U koniowatych diagnoza ciąży jest możliwa od około 100 dnia aż do porodu i polega na stwierdzeniu w próbach kału wysokich koncentracji



Ryc. 2. Schemat krążenia w organizmie i wydalania steroidowych hormonów płciowych

estrogenów. Oznaczenia przeprowadzone w tym okresie dają blisko 100% pewność diagnostyczną. Pomiar te umożliwiają jednoczesne potwierdzenie żywotności płodu (2, 12, 13, 15-17, 20). Wynika to z faktu funkcjonowania u tej rodziny zwierząt jednostki płodowo-łożyskowej (3, 12-15, 26, 27). Biosynteza estrogenów, odbywająca się w płodowej części łożyska (3), jest uzależniona od dostępności płodowego dehydroepiandrosteronu (DHEA), którego źródłem są gonady płodu. Spadek poziomu estrogenów w przebiegu ciąży wskazuje przez to na jej zaburzenia związane z zamieraniem płodu (3, 12-17, 27).

Precyzyjna diagnoza ciąży jest możliwa także u przeżuwaczy po 120 dniu od krycia, zaś u świniowatych między 25 a 30, po czym ponownie w okresie od 70 dnia po kryciu (2). Wzrost koncentracji estrogenów u obydwu wymienionych rodzin jest związany z biosyntezą łożyskową, która u tych zwierząt odbywa się jednak bez udziału płodu. Nie pozwala to tym samym na pełne wnioskowanie odnośnie fizjologicznego stanu płodu (2, 23). Inną możliwość zastosowania omawianej metody stanowi określanie terminu rui poprzez wykrywanie przedowulacyjnego wzrostu poziomu estrogenów. Dużą niezawodnością cechuje się ona u kotowatych i psowatych, a także u niektórych gatunków naczelnych (5, 24). U zwierząt tych estrogeny wydalone z kałem występują głównie w postaci siarczanu estradiolu-17 β (23). U przeżuwaczy natomiast diagnozowanie rui tym sposobem nie pozwala uzyskać pewnych wyników, co jest związane z generalnie niską koncentracją estrogenów w cyklu oraz ich wydalaniem głównie z moczem (2, 23).

Oznaczanie koncentracji estrogenów w kale ma także zastosowanie u zwierząt żyjących dziko, cechujących się sezonowością rozrodu. Metoda ta polega na stwierdzeniu podwyższonej zawartości estrogenów w kale w okresach, które odpowiadają aktywności płciowej (cykl) lub są jej konsekwencją (ciąża). Dzięki łatwości pobierania próbek ma ona zastosowanie zwłaszcza u zwierząt szczególnie niebezpiecznych lub płochliwych, prowadzących skryty tryb życia. Postępowanie to pozwala na uzyskanie niezwykle ciekawych informacji dotyczących sezonowości i behawioryzmu rozrodu tych zwierząt (23). Metoda ta jest również przydatna u samców tych gatunków, u których jądra produkują duże, często porównywalne do wartości występujących u ciężarnych samic, ilości estrogenów. Są to gatunki należące do rodziny koniowatych i świniowatych (2, 22, 23). Umożliwia ona wykrywanie zjawiska dominacji wśród zwierząt żyjących w grupach poprzez stwierdzenie dużych ilości estrogenów produkowanych przez jądra samców przewodników (23). Natomiast diagnozowanie wnętrza wynika z faktu, iż także gonady pozostające w jamie brzusznej lub kanale pachwinowym produkują duże ilości estrogenów. Pewną odmianą tego testu jest stymulacja przy użyciu hCG, po której ma miejsce wzmożona produkcja estrogenów przez jądra (22, 23).

Jeszcze innym zastosowaniem oznaczania zawartości estrogenów w kale jest ustalanie płci u zwierząt monomorficznych. W tym celu pomiary wykonywane są zwłaszcza u egzotycznych gatunków papug hodowlanych oraz ssaków z zatartym dymorfizmem płciowym, np. u pandy olbrzymiej (23). Zasada tego postępowania oparta jest na znacznych różnicach zawartości estrogenów oznaczanych w kale pomiędzy samcami a samicami tych gatunków zwierząt (23).

Określanie poziomu metabolitów progesteronu w kale jest natomiast stosowane z dobrym skutkiem do monitorowania funkcji ciała żółtego. Umożliwia to diagnozowanie fazy lutealnej cyklu, a przez to dojrzałości i aktywności płciowej oraz sezonowości rozrodu. Dotychczas możliwość taką opisano u słonia afrykańskiego, nosorożca sumatrzańskiego, nosorożca białego oraz niektórych naczelnych należących do rodziny *Callitrichidae*. Liczba gatunków zwierząt objętych badaniami nad zawartością metabolitów progesteronu w kale w różnych fazach cyklu płciowego wciąż rośnie (4, 5, 9-11, 23, 24). Metoda ta, w porównaniu do oznaczeń koncentracji estrogenów w kale, nie znajduje tak szerokiego zastosowania do diagnozowania ciąży oraz monitorowania funkcji łożyska. Przyczyną jest możliwość występowania dużego odsetka wyników fałszywie pozytywnych jako następstwa obecności tworów zbudowanych z tkanki luteinowej, takich jak ciało żółte przetrwałe i torbiele luteinowe (8, 9). Dodatkowym czynnikiem ograniczającym generalnie stosowanie tej metody jest to, iż jest ona trudniejsza analitycznie (23).

Zarówno estrogeny, jak i metoaboly progesteronu zawarte w kale oznaczane są przy pomocy metod analitycznych opartych na reakcji hormonów ze specyficznymi przeciwciałami. Są to powszechnie znane metody enzymatyczno-immunologiczna (EIA) oraz radioimmunologiczna (RIA). Przy doborze przeciwciał używanych do oznaczeń musi być uwzględniana opisana w niniejszym artykule wiedza o specyfice metabolicznej estrogenów i gestagenów u poszczególnych gatunków zwierząt w określonych fazach cyklu reprodukcyjnego (6, 12). Zastosowanie sprawdzonych sposobów ekstrakcji, jako pierwszego etapu analitycznego, oraz duża czułość metod (RIA, EIA) oznaczania koncentracji hormonów sterydowych w kale, niosą ze sobą wysoką powtarzalność. Określa to wysoką wiarygodność analityczną całego postępowania (6).

Zaletą omawianej metody jest stabilność poziomu hormonów sterydowych w próbach kału. Umożliwia to gromadzenie ich w sposób tani i praktyczny. Stosuje się do tego celu torebki plastikowe bez konieczności dodatkowej konserwacji prób (2, 12, 23). Przechowywanie kału w temperaturze otoczenia przez okres kilku dni nie wpływa znacząco na skład i zawartość hormonów (2, 23). Pozwala to także na łatwe i bezpieczne przesyłanie prób do laboratorium pocztą kurierską (12). Jeżeli jednak analizy będą znacznie oddalone w czasie, próbki powinny zostać zamrożone w

temperaturze -20°C aż do momentu ich oznaczania (2, 12, 15-17, 22, 23). Także istotną zaletą metody, podwyższającą jej praktyczną użyteczność, jest reprezentatywność jednej tylko próbki. Rodzaj i skład skarmianej paszy, a także związany z tym stopień wilgotności kału, nie zmieniają istotnie rodzaju oraz zawartości sterydów. Dowodzą tego wyniki badań przeprowadzanych z kałem świeżym, a także w różnym stopniu wysuszonym, w których uzyskano taką samą wartość hormonów (2, 23).

Przedstawione zalety metody takie jak łatwość pobierania i biologiczna reprezentatywność jednej tylko próbki, a także prosta interpretacja powodują, że oznaczanie poziomu hormonów sterydowych w kale powinno znaleźć w kraju szersze niż dotychczas zainteresowanie. Stwarza ono możliwość wykorzystania metody u zwierząt gospodarskich, przy czym najpowszechniejsze zastosowanie ma u koni w celu potwierdzenia ciąży po 100 dniu. U tego gatunku ma to istotne znaczenie ze względu na duże zagrożenie jej utraty poprzez zamieranie zarodków i płodów oraz ronienia. Przede wszystkim jednak jest cenną pomocą w kontroli rozrodu zwierząt w ogrodach zoologicznych, żyjących półdziko w rezerwatach i parkach przyrodniczych, a także wolno w warunkach naturalnych. U tych zwierząt stanowi bowiem jedyną praktyczną możliwość kontrolowania przebiegu procesów rozrodczych. Godna podkreślenia jest także możliwość zastosowania jej w programach reintrodukcji zwierząt zagrożonych lub ginących, zarówno egzotycznych, jak i stanowiących element rodzimej fauny.

Piśmiennictwo

1. Angielski S., Jakubowski Z., Dominiczak M. H.: Biochemia kliniczna. Wydawnictwo Perseusz, Sopot 1996, s.250.
2. Bamberg E., Choi H. S., Möstl E.: Pregnancy testing in large animals by the determination of oestrogens in faeces. *Isr. J. Vet. Med.* 1986, 42, 368-372.
3. Biełański A., Tischner M.: Biotechnologia rozrodu zwierząt udomowionych. Wyd. DRUKPOL S. C., Kraków 1998.
4. Brannian J. D., Griffin F., Papkoff H., Terranova P. F.: Short and long phases of progesterone secretion during the oestrus cycle of the African elephant (*Loxodonta africana*). *J. Reprod. Fert.* 1988, 84, 357-365.
5. Brown J. L., Wildt D. E., Wielebnowski N., Goodrowe K. L., Graham L. H., Wells S., Howard J. G.: Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by fecal steroids. *J. Repr. Fert.* 1996, 106, 337-346.
6. Dembińska-Kieć A., Naskalski J. W.: Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Volumed, Wrocław 1998, s.94.
7. Ganong W. F.: Podstawy fizjologii lekarskiej. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 1994.
8. Ginther O. J.: Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare. *Equiservices*, USA 1986.
9. Gunther J. D., Foley C. W., Gaverick H. A., Plotka E. D.: Comparison of milk and blood plasma progesterone concentrations in cycling and pregnant mares. *J. Anim. Sci.* 1980, 51, 1131-1138.
10. Heistermann M., Agil M., Buthe A., Hodges J. K.: Metabolism and excretion of oestradiol-17 β and progesterone in the Sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*). *Anim. Reprod. Sci.* 1998, 53, 157-172.
11. Heistermann M., Tari S., Hodges J. K.: Measurement of fecal steroids for monitoring ovarian function in New World primates, *Callitrichidae*. *J. Reprod. Fert.* 1993, 99, 243-251.
12. Henderson K. M., Perkins N. R., Wards R. L., Stewart J. I.: Non-invasive pregnancy determination in mares by enzymeimmunoassay of estron sulphate concentrations in faeces. *Proc. New Zealand Society Anim. Prod.* 1997, 57, 234-236.
13. Hyland J. H., Wright P. J., Manning S. J.: An investigation for use of plasma oestrone sulphate concentrations for the diagnosis of pregnancy in mares. *Australian Vet. J.* 1984, 61, 123-124.
14. Kasman L. H., Hughes J. P., Stabenfeldt G. H., Starr M. D., Lasley B. L.: Estrone sulfate concentrations as an indicator of fetal demise in horses. *Anim. J. Vet. Res.* 1988, 49, 184-187.
15. Kirkpatrick J. F., Lasley B. L., Shideler S. E., Roser J. F., Turner J. W.: Non-instrumented immunoassay field tests for pregnancy detection in free-roaming feral horses. *J. Wildl. Manag.* 1993, 57, 168-173.
16. Kirkpatrick J. F., Shideler S. E., Lasley B. L., Turner J. W. Jr.: Pregnancy determination in uncaptured feral horses by means of fecal steroid conjugates. *Theriogenology* 1991, 35, 753-760.
17. Kuckelkorn B.: Assessment of pregnancy in kiang mares (*Equus hemionus holdereri*) using estrogen determination in faeces. *Theriogenology* 1994, 42, 37-41.
18. McCaughey W. J., Hanna J., O'Brien J. J.: A comparison of three laboratory tests for pregnancy diagnosis in the mare. *Eq. Vet. J.* 1983, 5, 94-95.
19. Minakowski W., Weidnera St.: Biochemia kręgowców. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 1998, s.777.
20. Möstl E., Nobauer H., Choi H. S., Wurm W., Bamberg E.: Trachtigkeitsdiagnose bei der Stute mittels Ostrogenbestimmung im Kot. *Prakt. Tierarzt.* 1983, 6, 491-492.
21. Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.: Biochemia Harpera. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 1995, s.699.
22. Palme R., Holzmann A., Mitterer Th.: Measuring fecal estrogens for the diagnosis of cryptorchidism in horses. *Theriogenology* 1994, 42, 1381-1387.
23. Schwarzenberger F., Mostl E., Palme R., Bamberg E.: Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Anim. Repr. Sci.* 1996, 42, 515-526.
24. Schwarzenberger F., Walzer C., Tomasova K., Vahala J., Meister J., Goodrowe K. L., Zima J., Straub G., Lynch M.: Fecal progesterone metabolite analysis for non-invasive monitoring of reproductive function in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum*). *Anim. Reprod. Sci.* 1998, 53, 173-190.
25. Stryer L.: Biochemia. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 1997, s.750.
26. Terqui M., Palmer E.: Oestrogen pattern during early pregnancy in the mare. *J. Reprod. Fert.* 1979, Suppl. 27, 441-446.
27. Wierzbowski S., Kosiniak-Kamysz K.: Kierowany rozród koni. Wyd. DRUKPOL S.C., Kraków 1998.

Adres autora: lek. wet. Agnieszka Skolimowska, ul. Oczapowskiego 14, 10-719 Olsztyn; e-mail: slonce66@wp.pl

ROY T. J., PRIETO L., GIL M. C.: Masa jąder i najądrzy u psa domowego (*Canis familiaris*). (Testicular and epididymal weights in the domestic dog (*Canis familiaris*)). *Vet. Rec.* 150, 285, 2002 (9)

Określono masę jąder i najądrzy w ciągu 10 minut po ich wypreparowaniu od 29 psów różnych ras i różniących się masą ciała, które poddano eutanazji. Średnia masa ciała psów wynosiła 15.4 ± 1.9 kg. Średnia masa prawego jądra wynosiła 9.93 ± 0.9 g ($3.04-20.78$ g), lewego jądra 9.94 ± 1.0 g ($3.18-22.01$ g), prawego najądrza 2.02 ± 0.2 g ($0.65-6.15$ g) oraz lewego najądrza 2.02 ± 0.2 g ($0.42-6.16$ g). Występowała duża korelacja pomiędzy masą jąder i masą ciała psów ($r=0.88$) oraz pomiędzy masą najądrzy i masą ciała ($r=0.80$). Stwierdzono też dużą korelację pomiędzy masą najądrzy i masą jąder ($r=0.88$) przy $p < 0.01$.

G.

EDMONDSON P.: Wpływ dojarek mechanicznych na występowanie zapalenia gruczołu mlekowego. (Influence of milking machines on mastitis). In *Practice* 23, 150-159, 2001 (3)

U krów dojonych mechanicznie odsetek zapaleń gruczołu mlekowego jest wyraźnie wyższy aniżeli u krów dojonych ręcznie. Za pośrednictwem doju mechanicznego są przenoszone do gruczołu mlekowego bakterie chorobotwórcze. Uszkodzona na skutek doju mechanicznego skóra strzyków, wytwarzanie podciśnienia w kanale strzykowym, umożliwiają wniknięcie zarazków do gruczołu mlekowego. Zakażenie ułatwia zaleganie mleka w kanale strzykowym. Uszkodzona skóra strzyków jest idealnym środowiskiem do rozwoju zakażenia wywołanego przez *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*. Często obserwowanym efektem stosowania dojarek jest hiperkeratoza końca strzyków.

G.