

Koncentracja estrogenów w kale i krwi u klaczy ras: pełna krew angielska i konik polski podczas ciąży

AGNIESZKA SKOLIMOWSKA, TOMASZ JANOWSKI, MAŁGORZATA GOLONKA*

Katedra Położnictwa i Patologii Rozrodu Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM, ul. Oczapowskiego 14, 10-957 Olsztyn
*Stacja Badawcza Rolnictwa Ekologicznego i Hodowli Zachowawczej Zwierząt PAN w Popielnie, 12-222 Wejsuny

Skolimowska A., Janowski T., Golonka M.

Estrogen concentration in the feces and blood of Full-blood and Polish Horse mares during pregnancy

Summary

The study determined the total unconjugated estrogen concentration in the feces of 17 full-blood mares (*Equus caballus* sp.) and 13 Polish Horses mares (*Equus caballus gmelini* s. *gmelini silvatica*) during pregnancy and compared it with the profile of these estrogens in the blood plasma. Fecal and blood samples were collected once a week until day 120 of pregnancy and from day 120 of pregnancy to parturition once every two weeks. The total unconjugated estrogen concentration in the feces and blood plasma was measured by radioimmunoassay (RIA) with extraction. The first increase of the estrogen level in the feces and blood plasma was observed about week 16 of pregnancy. The maximum concentration of this hormone was obtained at week 25 of pregnancy and remained on a high level up until week 40. After this there was a gradual decrease of estrogen levels until parturition. The fecal and blood estrogen levels were similar during pregnancy, but their concentration in feces was 200 times higher than in the blood plasma. The comparative concentration of this hormone was similar in the mares of both breeds. A statistically significant difference in the average estrogen level was observed only during some phases of pregnancy; however this seems to be of little biological importance. The unconjugated estrogen level in feces reflects its production and metabolism during pregnancy in mares. The results of the study suggest that this method can be used to diagnose physiological and pathological pregnancy in the Equidae family.

Keywords: mares, pregnancy, estrogens, feces, blood

Jedną z istotniejszych odmienności hormonalnej regulacji ciąży u koni jest biosynteza i sekrecja estrogenów (11). Cechuje się ona dwufazowością, przy czym pierwszy wzrost stężenia estrogenów we krwi występuje około 35.-40. dnia po zapłodnieniu i jest związany z ich powstawaniem w pęcherzykach dodatkowych (6, 7, 11, 13, 24). Od około 70. dnia ciąży ma miejsce drugi wzrost poziomu estrogenów pochodzenia łożyskowego (3, 6, 8, 9, 11-13, 17, 18, 23, 24). Około 22. tygodnia hormony te osiągną maksimum, by następnie stopniowo opadać aż do porodu (3, 8, 11, 17, 19). Łożysko koniowatych, funkcjonujące jako jednostka płodowo-łożyskowa, produkuje zarówno skońiugowane, jak i nieskońiugowane formy estrogenów, przy czym dominującą frakcją jest estron (3, 6, 11, 17-19).

Zjawisko metabolizowania estrogenów w wątrobie i ich wydalania z żółcią drogą przewodu pokarmowego stało się podstawą do stosowania oznaczania zawartości tych hormonów w kale jako metody kontroli procesów rozrodczych (2, 9, 10, 14, 16, 21, 22).

U klaczy postępowanie to znalazło zastosowanie głównie do diagnozowania ciąży, przez co dotyczyło

wstępnej jej fazy (2, 9, 10, 14). Brak natomiast w piśmiennictwie światowym, oprócz pracy Möstla i wsp. (16), opisu profilu tych hormonów w przebiegu całej ciąży.

Zasadniczym celem badań było określenie zawartości estrogenów w kale u klaczy dwóch ras w przebiegu ciąży oraz porównanie jej z ich stężeniami we krwi. Dodatkowy aspekt pracy stanowiło porównanie koncentracji estrogenów w kale i krwi u klaczy różnych ras.

Materiał i metody

Badaniami objęto łącznie 30 ciężarnych klaczy w wieku od 3 do 19 lat, tworzących dwie grupy doświadczalne. Pierwszą (I) z nich stanowiło 17 klaczy pełnej krwi angielskiej (*Equus caballus* sp.) pochodzących ze Stadniny Koni Rzeczna, drugą (II) zaś – 13 klaczy rasy konik polski (*Equus caballus gmelini* s. *gmelini silvatica*) przebywających w Stacji Badawczej PAN w Popielnie.

Próbki kału i krwi w okresie od zażrebiecia do 120. dnia ciąży pobierano raz w tygodniu, zaś od 120. dnia ciąży do porodu – jednorazowo w ciągu dwóch tygodni. Próbki kału o masie ok. 50 g pobierano z podłoża, sporadycznie zaś

pozyskiwano je bezpośrednio z prostnicy. Do laboratorium transportowano je w stanie schłodzonym, a następnie zamrażano aż do czasu oznaczeń (-20°C). Próbkę krwi pobierano z żyły jarzmowej do podciśnieniowych probówek z heparyną sodową (Vacuette®), wirowano przez 20 minut przy 2000 obrotów/min., a uzyskane osocze do czasu analiz przechowywano w temperaturze -20°C .

Diagnozowanie i kontrolę ciąży przeprowadzano badaniami: rektalnym i ultrasonograficznym wg klasycznych reguł. Dla obu grup obliczono średnią długość ciąży.

Poziom całkowitych estrogenów nieskoniugowanych (sumę estronu, estradiolu 17β , estradiolu 17α i estriolu) w kale oznaczano metodą radioimmunologiczną (RIA) z ekstrakcją. Próbkę o masie 0,5 g odważano bezpośrednio przed analizami ze środkowej części próby pierwotnej. Następnie, po dodaniu 1,5 ml KOH (1 mol/l) i 0,5 ml mieszaniny chloroform/n-heksan w stosunku 6 : 4, całość wytrząsano przez 30 min. przy pomocy wytrząsarki rotacyjnej, po czym wirowano przez kolejne 15 min. ($1500 \times g$). Wydajność ekstrakcji wynosiła 98,0%. 10 μl uzyskanego w opisany sposób nadsącza wykorzystywano do oznaczeń RIA. Czulość metody wynosiła 14,1 pg, zaś zmienność wewnątrz- i zewnątrzserijna – odpowiednio: 5,5% i 13,9%. Poziom całkowitych estrogenów nieskoniugowanych w osoczu oznaczano metodą RIA z ekstrakcją eterem etylowym. Wydajność ekstrakcji wynosiła 92,0%, czulość metody – 5,6 pg, zaś zmienność wewnątrz- i zewnątrzserijna – odpowiednio: 5,0% i 11,7%.

Obliczono średnią koncentrację estrogenów w kale i krwi dla obu grup doświadczalnych, a uzyskane wyniki porównano statystycznie za pomocą testu t-Studenta. Obliczenia wykonano przy użyciu programów komputerowych Graph Pad, Microsoft Access 2000 i Microsoft Excel 2000. Przyjęto dwa poziomy istotności: $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$.

Wyniki i omówienie

U zwierząt obydwu grup doświadczalnych ciąża miała fizjologiczny przebieg i trwała u klaczy rasy pełna krew angielska średnio 335 (317-356) dni, zaś u klaczy rasy konik polski – 334 (329-341) dni. Poziom całkowitych estrogenów nieskoniugowanych w kale i krwi wzrastał wraz z rozwojem ciąży, wykazując zbliżony przebieg u zwierząt obydwu ras. Jednakże koncentracje estrogenów w kale były blisko 200 razy wyższe aniżeli we krwi. Estrogeny nieskoniugowane osiągały maksimum w 25. tygodniu, po czym, mimo pewnych wahań, utrzymywały się na wysokim poziomie do ok. 40. tygodnia. W dalszym przebiegu ciąży, do porodu miał miejsce stopniowy spadek stężenia estrogenów (ryc. 1 i 2).

Uzyskane w niniejszych badaniach wartości całkowitych estrogenów nieskoniugowanych we krwi ciążarnych klaczy pełnej krwi angielskiej i konika polskiego odpowiadają typowemu dla okresu ciąży profilowi tych hormonów u koni (3, 6, 8, 11, 12, 17, 18). Nie potwierdzono jedynie występującego między 35. a 40. dniem po zażebieniu wzrostu koncentracji estrogenów pochodzących z pęcherzyków dodatkowych (4, 6, 7, 11, 13, 24). Było to wynikiem zastosowanej

metody analitycznej. Do oznaczeń użyto bowiem przeciwciał wiążących frakcje estrogenów nieskoniugowanych, podczas gdy hormony pochodzenia jajnikowego to głównie formy skoniugowane (6, 11). Jednakże oznaczanie estrogenów nieskoniugowanych było wskazane ze względu na fakt ich dominacji w kale (21).

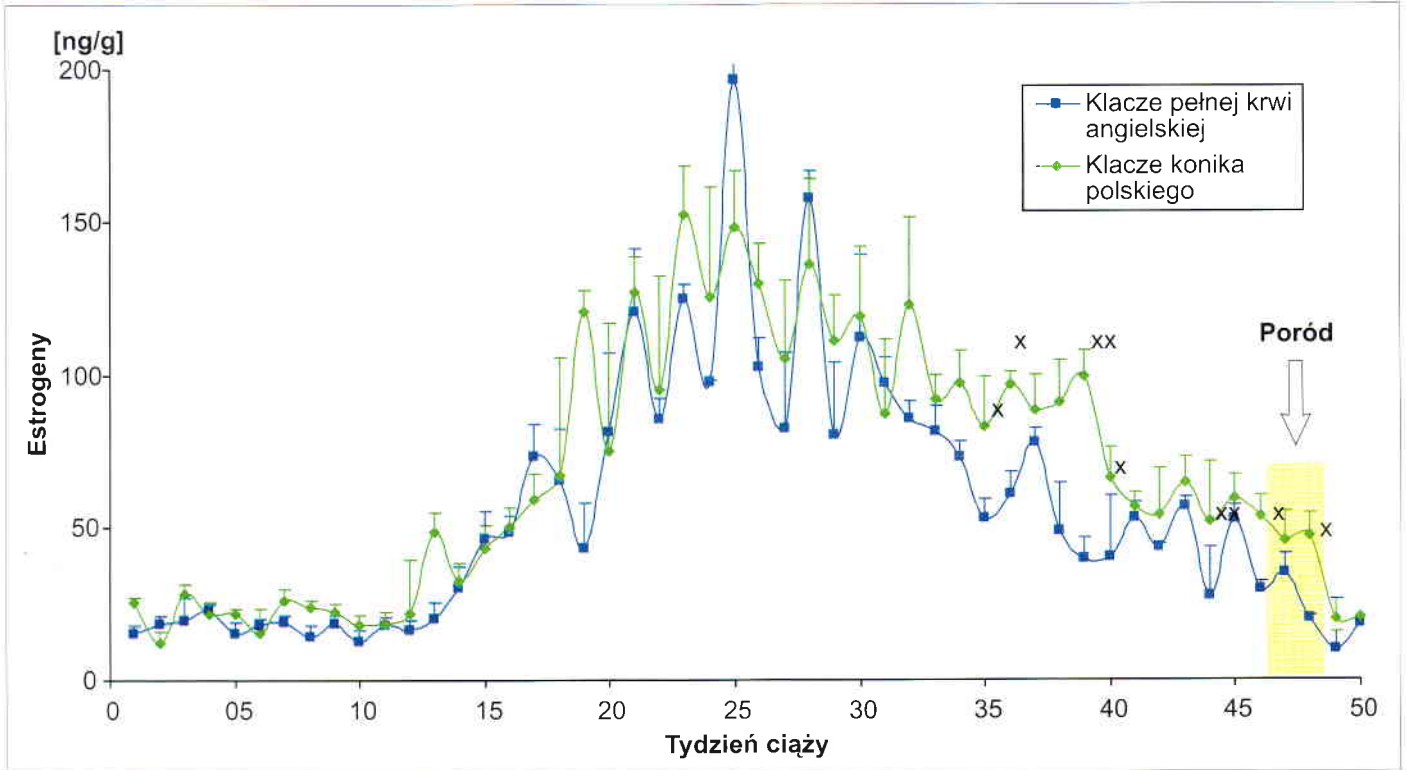
Porównując dynamikę zmian koncentracji estrogenów we krwi z profilami tych hormonów w kale, można stwierdzić ich dużą zbieżność, obserwowaną przy tym u obu badanych ras. Podobne do otrzymanych w badaniach własnych wyniki dotyczące poziomu estrogenów w kale podczas ciąży uzyskali Möstl i wsp. (16). Była to dotychczas jedyna publikacja poświęcona tej problematyce. Pozostałe doniesienia uwzględniały jedynie niektóre okresy ciąży, głównie zaś przełom pierwszego i drugiego trymestru. Było to związane z praktycznie użyteczną możliwością diagnozowania ciąży przy użyciu oznaczeń estrogenów w kale (2, 9, 10, 14, 21).

Wykazana w niniejszych badaniach duża zgodność przebiegu profili estrogenów w kale i krwi podczas ciąży jest konsekwencją ich biosyntezy w łożysku, procesów transportu do tkanek docelowych drogą krwi, a także ich metabolizowania i wydalania z organizmu. Te ostatnie polegają ogólnie na sprzęganiu hormonów z resztą kwasu siarkowego lub glukuronowego w wątrobie oraz wydalaniu z żółcią do przewodu pokarmowego, gdzie następuje ich hydroliza w wyniku oddziaływania enzymów bakteryjnych (4, 5, 21). W następstwie tych procesów w kale zdecydowanie przeważają estrogeny nieskoniugowane (2, 21). Warto także zwrócić uwagę, iż ilości estrogenów eliminowane tą drogą są ogromne, przez co ich koncentracja w kale jest kilkaset razy wyższa niż we krwi (16, 22).

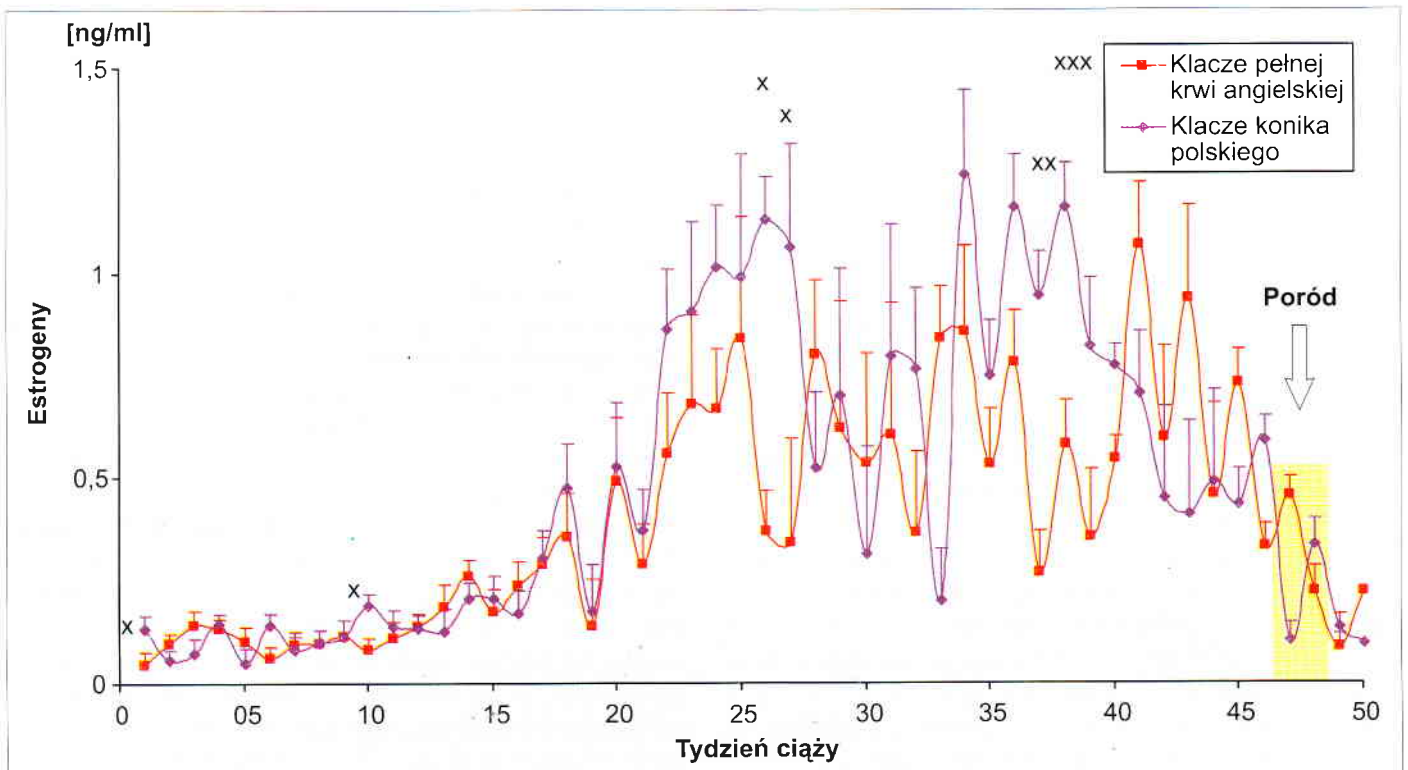
Nowym aspektem badań własnych było porównanie koncentracji estrogenów w kale i krwi podczas ciąży u klaczy dwóch różnych ras: pełnej krwi angielskiej oraz konika polskiego. Dobór koni rasy szlacheckiej oraz wywodzącej się od tarpana rasy prymitywnej pozwolił na podjęcie problematyki nie poruszanej dotychczas w piśmiennictwie. Generalnie, uzyskane wyniki potwierdziły wysoką zgodność zawartości estrogenów w przebiegu ciąży u powyższych ras, ponieważ statystycznie istotne różnice w poziomie estrogenów wykazano tylko w niektórych okresach ciąży, głównie w okresie przedporodowym (ryc. 1 i 2). Jest jednak wątpliwe, czy posiadają one biologiczne znaczenie. Powszechnie znany jest bowiem fakt dużych indywidualnych różnic w poziomie estrogenów u poszczególnych zwierząt przy fizjologicznie przebiegającej ciąży u każdego z nich (9, 10, 14). Zjawisko to ma miejsce zwłaszcza u samic młodych, o nieuregulowanym jeszcze statusie hormonalnym (14). Należy podkreślić, iż stwierdzone w badaniach własnych koncentracje estrogenów były zawsze typowe dla fizjologicznej ciąży u klaczy. Wydaje się więc, że główną przyczyną wcześniejszego spadku koncentracji estrogenów w okresie przedporodowym u klaczy pełnej

krwi angielskiej była krótsza ciąża u dużej liczby osobników tej rasy w stosunku do bardziej wyrównanego w grupie, późniejszego terminu wyźrebień u klaczy konika polskiego. Należy jednak zaznaczyć, że koncentracje łożyskowych estrogenów w ciąży u klaczy obu badanych ras, mimo ich niewielkiego zróżnicowania

wynikającego z odmiennych terminów wyźrebień, są bardzo zbliżone. Nie potwierdza to tym samym istnienia rasowych różnic odnośnie sekrecji estrogenów ciążowych u przedstawicieli gatunku koń właściwy (*Equus caballus*). Wcześniej wykazano bowiem odmienności w hormonalnej regulacji ciąży mię-



Ryc. 1. Średnia koncentracja całkowitych estrogenów nieskoniugowanych ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) w kale źrebnych klaczy pełnej krwi angielskiej i konika polskiego (x - $p \leq 0,05$; xx - $p \leq 0,01$)



Ryc. 2. Średnia koncentracja całkowitych estrogenów nieskoniugowanych ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) we krwi źrebnych klaczy pełnej krwi angielskiej i konika polskiego (x - $p \leq 0,05$; xx - $p \leq 0,01$; xxx - $p \leq 0,001$)

dzy poszczególnymi gatunkami należącymi do rodziny koniowatych (*Equidae*) (1, 22).

U koni interesującym zjawiskiem jest obserwowany zarówno we krwi, jak i w kale stopniowy spadek koncentracji estrogenów w ostatnim trymestrze ciąży. Zjawisko takie nie występuje u innych gatunków zwierząt, u których przed porodem ma miejsce stały wzrost poziomu całkowitych estrogenów nieskoniugowanych (11). Być może u koniowatych obniżanie się koncentracji klasycznych form estrogenów rekompensuje produkcja charakterystycznych dla tego gatunku estrogenów nienasyconych, takich jak equilina i equilenina.

Poziom estrogenów nieskoniugowanych w kale stanowi pełne odzwierciedlenie ich produkcji i metabolizmu podczas ciąży u klaczy. Dzięki temu metoda ta może być interesującym i przydatnym dla praktyki narzędziem służącym diagnozowaniu fizjologicznego i patologicznego przebiegu ciąży u koniowatych. Jej dodatkową zaletą jest nieinwazyjny charakter oraz łatwy sposób uzyskiwania próbek. Ma to ogromne znaczenie, zwłaszcza w odniesieniu do ras koni żyjących dziko lub w warunkach rezerwatów i ogrodów zoologicznych, bowiem stanowi u nich jedyną praktycznie użyteczną możliwość monitorowania ciąży.

Piśmiennictwo

- Allen W. R., Kydd J. H., Boyle M. S., Antczak D. F.: Extraspecific donkey-in-horse pregnancy as a model of early fetal death. *J. Reprod. Fert.* 1987, Suppl. 35, 197-209.
- Bamberg E., Choi H. S., Möstl E., Wurm W., Lorin D., Arbeiter K.: Enzymatic determination of unconjugated oestrogens in faeces for pregnancy diagnosis in mares. *Equ. Vet. J.* 1984, 16, 537-539.
- Cox J. E.: Oestrone and equilin in the plasma of the pregnant mare. *J. Reprod. Fert.* 1975, Suppl. 23, 463-468.
- Evans K. L., Hughes J. P., Couto M., Kasman L. H., Lasley B. L.: Pregnancy diagnosis in the domestic horse through direct urinary estrone conjugate analysis. *Theriogenology* 1984, 22, 615-620.
- Ganong W. F.: Podstawy fizjologii lekarskiej. PZWL, Warszawa 1994, 534-538, 546.
- Ginther O. J.: Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare. *Equi-services. USA* 1986, 122-124, 166, 229-246, 253-282.
- Ginther O. J., Bergfelt D. R.: Associations between FSH concentrations and major and minor follicular waves in pregnant mares. *Theriogenology* 1992, 38, 807-821.
- Haluska G. J., Currie W. B.: Variation in plasma concentrations of estradiol-17 β and their relationship to those of progesterone, 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F-2 α and oxytocin across pregnancy and at parturition in pony mares. *J. Reprod. Fert.* 1988, 84, 635-646.
- Henderson K., Stevens S., Bailey C., Hall G., Stewart J., Wards R.: Comparison of the merits of measuring equine chorionic gonadotrophin (eCG) and blood and faecal concentrations of estrone sulphate for determining the pregnancy status of miniature horses. *Reprod. Fertil. Dev.* 1998, 10, 441-444.
- Henderson K. M., Perkins N. R., Wards R. L., Stewart J. I.: Non-invasive pregnancy determination in mares by enzyme immunoassay of estrone sulphate concentrations in faeces. *Proc. N. Z. Soci. Anim. Prod.* 1997, 57, 234-236.
- Hoffmann B., Gentz F., Failing K.: Investigations into the course of progesterone-, oestrogen- and eCG- concentrations during normal and impaired pregnancy in the mare. *Reprod. Dom. Anim.* 1996, 31, 717-723.
- 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.
- Kindahl H., Knudsen O., Madej A., Edqvist L. E.: Progesterone, prostaglandin F-2 α , PMSG and estrone sulphate during early pregnancy in the mare. *J. Reprod. Fert.* 1982, Suppl. 32, 353-359.
- Kuckelkorn B.: Assessment of pregnancy in kiang mares (*Equus hemionus holdereri*) using estrogen determination in faeces. *Theriogenology* 1994, 42, 37-41.
- Möstl E.: The horse foeto-placental unit. *Exp. Clin. Endocrinol.* 1994, 102, 166-168.
- Möstl E., Nobauer H., Choi H. S., Wurm W., Bamberg E.: Trächtigkeitsdiagnose bei der Stute mittels Oestrogenbestimmung im Kot. *Prakt. Tierärz.* 1983, 64, 491-492.
- Nett T. M., Holtan D. W., Estergree V. L.: Plasma oestrogens in pregnant and postpartum mares. *J. Anim. Sci.* 1973, 37, 962-970.
- Nett T. M., Holtan D. W., Estergree V. L.: Oestrogens, LH, PMSG and prolactin in serum of pregnant mares. *J. Repr. Fert.* 1975, Suppl. 23, 457-462.
- Pashen R. L., Allen W. R.: The role of fetal gonads and placenta in steroid production, maintenance of pregnancy, and parturition in the mare. *J. Reprod. Fertil.* 1979, Suppl. 27, 499-509.
- Pashen R. L., Sheldrick E. L., Allen W. R., Flint A. P. F.: Dehydroepiandrosterone synthesis by the fetal foal and its importance as an oestrogen precursor. *J. Rprod. Fert.* 1982, Suppl. 32, 389-397.
- Schwarzenberger F., Möstl E., Palme R., Bamberg E.: Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Anim. Reprod. Sci.* 1996, 42, 515-526.
- Skolimowska A.: Monitorowanie ciąży u koniowatych przy użyciu metody oznaczania estrogenów w kale. Praca dokt., Wydz. Med. Wet., UWM Olsztyn, 2002.
- Terqui M., Palmer E.: Oestrogen pattern during early pregnancy in the mare. *J. Reprod. Fert.* 1979, Suppl. 27, 441-446.
- Zavy M. T., Vernon M. W., Sharp D. C., Bazer F. W.: Endocrine aspects of early pregnancy in pony mares: a comparison of uterine luminal and peripheral plasma levels of steroids during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology* 1984, 115, 214-219.

Adres autora: dr Agnieszka Skolimowska, ul. Oczapowskiego 14, 10-957 Olsztyn; e-mail: slonce66@wp.pl

STAN ZAKAŻNYCH CHOROBY ZWIERZĄT W POLSCE

według danych Głównego Inspektoratu Weterynarii w październiku 2003 r.*)

- Wścieklizna zwierząt domowych** – wystąpiła w 3 województwach: lubelskim (1-1), podlaskim (1-4) i wielkopolskim (2-2). Stwierdzono ją u 2 kotów, 1 psa i 4 sztuk bydła.
- Wścieklizna zwierząt dzikich** – wystąpiła w 5 województwach: kujawsko-pomorskim (1-1), lubelskim (1-1), świętokrzyskim (1-1), warmińsko-mazurskim (1-4) i wielkopolskim (4-8). Zanotowano ją u 7 lisów i 8 jenotów.
- Zgnilec amerykański pszczoł** – wystąpił w 2 województwach: dolnośląskim (1-1) i pomorskim (1-1).

*1) W nawiasach podano liczbę powiatów i miejscowości, w których choroba została stwierdzona w okresie sprawozdawczym.