

Praktické aspekty laboratórnej diagnostiky pohlavných hormónov

V rutinej medicíne pohlavných orgánov koňa (pri manažmente krytia alebo inseminácie, diagnostike gravidity) stojí v popredí klinické, hlavne rektálne palpačné vyšetrenie kobyly, príp. doplnené ultrazvukom. Aj žrebce sú manažované primárne pomocou klinického andrologického vyšetrenia, doplneného vyšetrením ejakulátu. Pri určitých problémoch alebo vo zvláštnych situáciách môže byť potrebné stanovenie rôznych hormónov. Interpretácia laboratórných nálezov je zásadne možná len so zreteľom na kliniku a anamnestické údaje.

Pre samice aj pre samcov je k dispozícii rad hormónov, ktoré je možné vyšetriť. Ich výber závisí na probléme. Niektoré z týchto hormónov sú pohlavne nešpecifické a je potrebné ich interpretovať v závislosti od riešeného problému.

Pohlavné steroidy

Estradiol je synchronne s cyklom tvorený v ovariálnych folikuloch. Počas gravidity dochádza k masívnej biosyntéze estrogénov fetomaternálnej jednotky.

Progesterón je syntetizovaný v luteínových bunkách Corpus luteum. Hladina viac ako 1 ng/ml zodpovedá funkčnému žltému teliesku. Laboratórne diagnosticky nie je možné odlíšiť žlté teliesko cyklu a gravidity.

Testosterón je produkovaný v Leydigových bunkách semenníkov a v malom množstve aj v kôre nadobličiek. Počas dňa je nutné počítat s najnižšími hladinami testosterónu skoro ráno a s najvyššími popoludní. U kobýl sa tvorí malé množstvo hormónu v ováriách a v nadobličkách.

Upozornenie: Interpretácia analýzy sexuálnych steroidov je možná len v kontexte výsledkov klinického vyšetrenia. Pri niektorých problémoch sú o. i. potrebné funkčné testy.

Hormonálna diagnostika gravidity

Nie vždy je v praxi možné rektálne palpačné vyšetrenie. Často z celkom pragmatických dôvodov: malé kone/miniatúrne plemená, nepokojné a divoké zvieratá, zoo zvieratá, lézie rekta a pod. V takýchto prípadoch môže v konskej praxi pomôcť vyšetrenie hormónov špecifických pre graviditu.

PMSG/eCG sa tvorí medzi cca 35. a cca 120. dňom gravidity (individuálne je možné aj dlhšie) v „endometrial cups“. Najvyššie hodnoty name riame 60.-75. deň. V „okrajových oblastiach“ časového okna môže dôjsť k hraničným výsledkom, ktoré je potrebné potvrdiť dodatočnými vyšetreniami. Odporúčame odber vzorky medzi 45. a 100. dňom post ov. Tiež je potrebné brať ohľad na to, že po rezorpcii plodu môžu endometrial cups ešte niekoľko týždňov secernovať PMSG a dôkaz PMSG je potom falošne pozitívny, aj keď už nie je prítomný žiadny žijúci plod. U postihnutých kobýl tiež často dlhú dobu nedochádza k ruji. U kobýl, ktorých gravidita bola diagnostikovaná pomocou PMSG, musí byť potvrdená v neskoršom štádiu (po 110. dni) stanovením estronsulfátu.

Estronsulfát sa tvorí v intaktnej fetomaternálnej jednotke a poukazuje preto na žijúci plod. Hormón vo vzrastajúcich hladinách môžeme dokázať už od 40. dňa gravidity. Avšak v takto skorom štádiu nie je možná spoľahlivá diferenciácia od cyklickej sekrécie estrogénov. Odporúčame stanovenie estronsulfátu od 110. dňa post ov., pretože v tomto štádiu vykazujú kobyly výrazne vyššie hladiny.

Meranie estronsulfátu je možné aj z moču.

Cave: Nie všetky kobyly vykazujú typický vzor sekrécie. Pri hraničných alebo nerozhodných výsledkoch je potrebná kontrola o 3-4 týždne.

Negatívny výsledok testu u kobýl, ktoré sú určite gravidné viac ako 120 dní, môže indikovať

poškodenie plodu alebo placenty. V takom prípade nemôžeme vynechať rektálne palpačné vyšetrenie príp. ultrazvukové vyšetrenie.

Niekoľko poznámok k progesterónu: **Progesterón** nie je špecifický pre graviditu. Pokiaľ vyšetříme kobyľu 18-21. deň post ov. a preukážeme žlté teliesko, znamená to najprv len, že kobyľka nebude mať ruju v očakávanom termíne. Laboratórnou diagnostikou nie je možné odlíšiť žlté teliesko cyklu a gravidity. Často majú gravidné kobyly vyššie hodnoty progesterónu, ale to môže spôsobiť aj viacnásobná ovulácia. V ďalšom štádiu pokračujúcej gravidity (hl. > 50 dní) dochádza ešte raz k výraznému vzostupu koncentrácie hormónu, ale v tom čase už máme k dispozícii vyšetrenia iných hormónov, špecifických pre graviditu.

Diagnostika nádorov vaječníkov

U kobýl s anomáliami cyklu alebo správania, ktoré navyše vykazujú nápadné rektálne alebo sonografické nálezy, často stanovíme suspektnú diagnózu nádor vaječníka. Ovariálne tumory skutočne patria k najčastejším neoplaziám u koní. S veľkým nárastom sa pritom najčastejšie vyskytujú tumory buniek granulózy (GCT). Tento tumor je schopný produkovať **estradiol a testosterón**, avšak nedeje sa tak v každom prípade. Cca 50% postihnutých kobýl má zvýšené koncentrácie testosterónu. Tieto hormóny môžeme využiť pri hľadaní diagnózy. Pritom je ale potrebné brať do úvahy, že kobyly s nádorom môžu mať normálne hladiny hormónov a že zvýšené hladiny je možné nájsť aj u iných anomálií cyklu a u gravidných zvierat. **Progesterón** je u kobýl s GCT skoro vždy veľmi nízky. Tieto kobyly môžu byť anestrické, v permanentnej ruji, môžu vykazovať žrebčie správanie. Vo veľmi zriedkavých prípadoch môžu mať cyklus, ale bez ovulácie a bez tvorby žltého telieska.

Anti-Müller-hormón (AMH) je glykoproteín, ktorý zohráva dôležitú úlohu počas embryonálneho vývoja pri sexuálnej diferenciacii. U samíc je secernovaný bunkami granulózy preantrálnych a malých antrálnych folikulov. Nakoľko je tumor buniek granulózy najčastejšie diagnostikovaným nádorom genitálneho traktu u kobýl,

bola zrejme snaha o zavedenie tohto diagnostického testu aj pre kobyly podobne, ako je tomu v humánnej medicíne. Kobyly s GCT vykazujú výrazne vyššie koncentrácie AMH v porovnaní so zdravými zvieratami. V súvislosti s diagnostikou GCT vykazuje AMH senzitivitu 95%.

V humánnej medicíne vypovedá stanovenie AMH aj o rezerve antrálnych folikulov ženy. Takéto použitie sa u koňa nedá uplatniť, pretože kobyly majú individuálne hladiny AMH. Museli by byť roky vyšetrované na AMH, aby sa dal zistiť pokles hladiny a zhoršené vyhliadky na oplodnenie.

Inhibín sa takisto syntetizuje v bunkách granulózy ovárií. Preto je u kobýl s GCT hladina sérového inhibínu výrazne zvýšená a dá sa využiť pre diagnostiku. Kvôli inhibínu dochádza nevyhnutne k supresii a nefunkčnosti kontra-laterálneho vaječníka.

Keďže vzorky na stanovenie inhibínu sa posielajú do USA, výsledky sú k dispozícii za dlhší čas, až do štyroch týždňov. Toto vyšetrenie je navyše veľmi drahé. Vyšetrenie AMH je s inhibínom rovnocenné a výsledky sú oveľa skôr, preto je pri podozrení na GCT vyšetrenie AMH vhodnejšie. Zriedkavo môže vyjsť hraničný výsledok (napr. v skorom štádiu neoplázie). V takom prípade je pre priblíženie k diagnóze možné doplnkové vyšetrenie na pohlavné steroidy. Väčšinou sa ale odporúča opakované vyšetrenie AMH po jednom až dvoch mesiacoch.

Diagnostika kryptorchizmu

Ide nielen o dôkaz kryptorchida ale aj nekompletne kastrovaného koňa – samca.

Jednorazové stanovenie testosterónu často nemá kvôli cirkadiálnym a sezónnym výkyvom dostatočnú výpovednú hodnotu.

HCG-stimulačný test / „Cox test“: Tento test bol dlhú dobu zlatým štandardom v diagnostike kryptorchizmu. Vychádza z princípu, že HCG má účinok LH.

Priebeh testu:

- Odber vzorky krvi, podľa možnosti ráno
= bazálna hodnota testosterónu
- hneď potom i.v. injekcia 5000-10000 IE HCG pro toto
- O 60 min odber vzorky krvi
= stimulovaná hodnota

Interpretácia: Kompletne kastrované kone vykazujú minimálne koncentrácie testosterónu a nízku alebo žiadnu stimuláciu. Významný vzostup testosterónu je naproti tomu dôkazom prítomnosti tkaniva produkujúceho testosterón. Zároveň je potrebné si všímať aj absolútne hodnoty. Koncentrácie testosterónu po stimulácii medzi 0,05 a 0,1 ng/ml sú hraničné a vyžadujú ďalšie vyšetrenia, napr. stanovenie Anti-Müller hormónu. Vyššie hodnoty svedčia o prítomnosti tkaniva semenníkov.

Obmedzenie: U koní do veku 18 mesiacov reagujú semenníky na injekciu HCG len obmedzene.

Anti-Müller-hormón (AMH) U žrebca je AMH produkovaný v Sertolliho bunkách. Zostáva vysoký do puberty a potom, s rastúcou produkciou testosterónu, začne klesať na nižšie hladiny. Napriek tomu sa pomocou stanovenia AMH dajú jednoznačne odlíšiť žrebce a kryptorchidy od kastrovaných zvierat. Koncentrácia AMH je u samca užitočným biomarkerom prítomnosti testikulárneho tkaniva a môže byť preto použitá k diagnostike kryptorchizmu. Tento test je možné použiť aj u mladých kastrovaných zvierat, na rozdiel od stanovenia napr. estronsulfátu.

Hraničné hodnoty sú zriedkavé. U veľmi starých žrebcoch však môže AMH zasa výrazne poklesnúť. U samcov môže stanovenie AMH pomôcť aj ako marker pri diagnostike zriedkavého nádoru Sertolliho buniek.

Estronsulfát je takisto možné využiť v diagnostike kryptorchizmu. Vyšetrenie však nemá dostatočne výpovednú hodnotu u koní a somárov do veku troch rokov. Kvôli tomuto obmedzeniu sa v diagnostike kryptorchizmu čoraz viac nahrádza stanovením AMH.

GnRH-stimulačný test je založený na rovnakom princípe ako HCG-stimulačný test. Použitím releasing hormónu sa navyše testuje aj os hypotalamus – hypofýza. Nie je to potrebné pri riešení problému kryptorchizmu, ale môže to byť zaujímavé pri otázkach subfertility.

Priebeh testu:

- Odber vzorky krvi, podľa možnosti ráno
= bazálna hodnota testosterónu
- hneď potom i.v. injekcia 0,04 mg GnRH pro toto
- O 60 min odber vzorky krvi
= stimulovaná hodnota

Interpretácia závisí na riešenom probléme. Pri kryptorchizme analogicky k HCG-stimulačnému testu. Pokiaľ hodnotíme funkciu hypofýzy, musíme stanoviť LH/FSH.

Tu však nie sú zatiaľ k dispozícii validované rutinné postupy.