

Állatorvostudományi Egyetem
Egzotikusállat- és Vadegészségügyi Tanszék

Hormonális alapú vemhességvizsgálat jaguárban (*Panthera onca*)

Készítette: Horváth Katalin Mária

Témavezetők:

Martine van Zijll Langhout DVM, dipl. ECZM, ARTIS Amsterdam Royal
Zoo főállatorvos

dr. Gál János PhD, dipl. ECZM, egyetemi docens, tanszékvezető ÁTE,
Egzotikusállat- és Vadegészségügyi Tanszék

Budapest, 2017

Tartalomjegyzék

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | Rövidítések jegyzéke..... | 2 |
| 2 | Bevezetés..... | 3 |
| 3 | Irodalmi áttekintés..... | 4 |
| 3.1 | A jaguár..... | 4 |
| 3.1.1 | Rendszertana..... | 4 |
| 3.1.2 | Morfológiai és anatómiai sajátosságai..... | 4 |
| 3.1.3 | Természetes élőhelye, előfordulása és életmódja..... | 5 |
| 3.1.4 | Szaporodása és utódnevelése..... | 6 |
| 3.1.5 | Fajmegőrzés..... | 6 |
| 3.2 | Hormonanalízis..... | 7 |
| 3.2.1 | A hormonmérés mintái..... | 7 |
| 3.2.2 | Hormonmérési módszerek..... | 8 |
| 3.2.3 | Hormonok..... | 9 |
| 3.2.3.1 | Ösztrogének..... | 9 |
| 3.2.3.2 | Progeszteron..... | 10 |
| 3.2.3.3 | PGFM..... | 11 |
| 4 | Célkitűzések..... | 12 |
| 5 | Módszerek..... | 13 |
| 5.1 | Vizsgálati alanyok..... | 13 |
| 5.2 | Ivarzási viselkedés-megfigyelés..... | 13 |
| 5.3 | Bélsár- és vizeletgyűjtés..... | 14 |
| 5.4 | Hormonszintmérés..... | 14 |
| 5.4.1 | Minta előkészítése..... | 15 |
| 5.4.2 | Szteroid extrakció..... | 15 |
| 5.4.3 | EIA..... | 16 |
| 5.4.3.1 | Progeszteron..... | 16 |
| 5.4.3.2 | PGFM..... | 18 |
| 6 | Eredmények..... | 20 |
| 6.1 | Viselkedés-megfigyelés..... | 20 |
| 6.2 | Hormonanalízis..... | 22 |
| 6.2.1 | Progeszteron..... | 23 |
| 6.2.2 | PGFM..... | 23 |
| 7 | Megbeszélés (következtetések)..... | 25 |
| 8 | Összefoglalás..... | 29 |
| 9 | Angol nyelvű cím és rövid összefoglalás..... | 30 |
| 10 | Irodalomjegyzék..... | 31 |
| 11 | Köszönetnyilvánítás..... | 35 |

1 Rövidítések jegyzéke

4PLC – four parameter logistic curve

AZA – Association of Zoos and Aquariums

CITES – Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora

CLIA – Chemiluminescence Immunoassay

EIA – Enzyme Immunoassay

g – gramm

µg – microgramm

IUCN – International Union for Conservation of Nature – Természetvédelmi

Világszövetség

kg - kilogramm

ng – nanogramm

nm – nanométer

m – méter

mg - milligramm

ml – milliliter

mtsai - munkatársai

PGF_{2α} – prosztaglandin F_{2α}

PGFM – 13,14-dihydro-15-keto-PGF_{2α}

RIA – Radioimmunoassay

SHBG – sex hormone-binding globulin

TMB – 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

2 Bevezetés

A ma élő 36 vadmacskafajból 23 fenyegetett vagy veszélyeztetett státuszban van természetes elterjedési területének legalább egy részén. A populáció csökkenésének fő okai az erdőirtások, a természetes élőhelyek megsemmisülése, illetve széttagolódása, valamint az ember-állat konfliktusok. *In situ* és *ex situ* természetvédelmi erőfeszítések egyaránt szükségesek ezen fajok kihalásának elkerülése érdekében. A szaporodásélettan endokrin változásainak megismerése elengedhetetlen a helyes tartási körülmények és az optimális párzási feltételek megteremtéséhez, valamint a szaporodásbiológiai beavatkozások elvégzéséhez. Vérminták használata a hormonszint ellenőrzéséhez a stressz okozta nagy kockázat miatt kontraindikált, különösen vemhes állatokban, ahol a stressz akár vetélést is okozhat. Az alkalmazott fizikai megfékezés, vagy kémiai szedáció nem-vemhes állatokban is befolyásolja a szervezetben hormonok leadását, és így a mintában mért koncentrációjukat is.

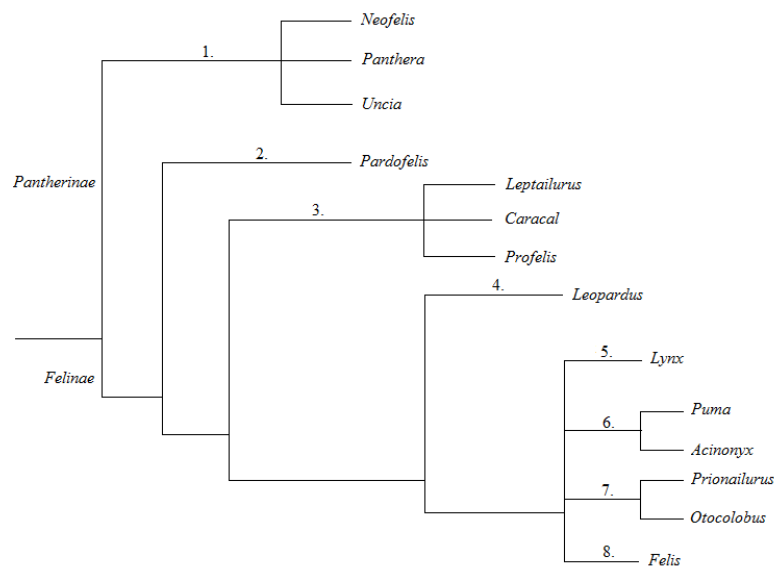
Nagymacskákban a reprodukív tulajdonságok fajspecifikusak. Például az ovulációs mechanizmusok (spontán vagy indukált ovulátor faj) nagy változatosságot mutatnak, nem csak fajok között, de még a fajon belül az egyedek szintjén is (Göritz és *mtsai.*, 2009; Brown, 2011). Például, míg a tigris (*Panthera tigris*), puma (*Felis concolor*), hópárduc (*Uncia uncia*), gepárd (*Acinonyx jubatus*) vagy a hiúz (*Lynx pardinus*, *Lynx lynx*) esetében spontán ovuláció nem fordul elő, addig oroszlánokban (*Panthera leo*), leopárdokban (*Panthera pardus*) vagy halászmacskákban (*Prionailurus viverrinus*) alkalmanként, ködfoltos párducokban (*Neofelis nebulosa*) és hosszúfarkú macskákban (*Leopardus wiedii*) pedig rendszeresen figyeltek meg spontán ovulációt. Hasonlóan megosztott a Felidae család szezonális szempontjából is: míg a tigrisek, ködfoltos párducok, hiúzek és hópárducok esetében beszélhetünk szezonálisról, addig a *Panthera* nemzetség nagymacskáiban, valamint a hosszúfarkú macskában és a halászmacskában a follikuláris aktivitásra semmilyen hatást nem gyakorol a megvilágított órák száma (Brown, 2006; Jewgenow és *mtsai.*, 2009). Ezekből a fajonkénti eltérésekből is adódóan a teljes taxonra vonatkozó általános következtetések levonása helyett a szaporodásbiológiai tulajdonságok vizsgálata fajonként szükséges.

3 Irodalmi áttekintés

3.1 A jaguár

3.1.1 Rendszertana

A jaguár (*Panthera onca*) a ragadozók rendjébe (*Carnivora*), a macskaalkatúak alrendjébe (*Feliformia*), ezen belül pedig a macskafélék családjába (*Felidae*) tartozó ragadozó faj. A macskafélék ma élő nemei nyolc fejlődési vonal mentén alakultak ki, melyek két alcsaládba sorolhatók: *Pantherinae* és *Felinae* (1. ábra).



1. ábra: A ma élő macskafélék törzsfája.

A jaguár faj alfajokra történő felosztását 1939-ben Pocock végezte. Pocock a koponya mérete és a földrajzi előfordulás alapján határozott meg nyolc alfajt, de a kategorizálás ellenére úgy vélte, hogy az egyének közötti változatosság erősebb, mint bármilyen rendszerezési módszer (Pocock, 1939). Módszerét az évek alatt többen újraértékelték, még mitokondriális DNS vizsgálat is történt az alfajok elkülönítésére, mely azonban nagyon gyenge filogenetikus különbségeket tudott csak detektálni (Eizirik és *mtsai.*, 2001). Következésképpen napjainkban a jaguár alfajok nélküli, monotípusos állatnak tekintendő.

3.1.2 Morfológiai és anatómiai sajátosságai

A jaguár a macskafélék családjának egyik nagytestű képviselője, az oroszlán és a tigris után a harmadik legnagyobb macskaféle. Testfelépítése hasonlít a leopárdéhoz, de

annál nagyobb és zömökebb. Az állatok testméretei nagy eltéréseket mutatnak a földrajzi előfordulásuk függvényében, így az átlagos testsúly és testhossz adatok is széles spektrumot ölelnek fel. A testsúly 56-136 kg tartományban mozog, míg a testhossz átlagosan 1,5-1,85 m. Az ivari dimorfizmus a testméretben nyilvánul meg, a nőstények átlagosan 10-20 százalékkal kisebbek a hímeknél (AZA, 2016). A szőrzet színe leggyakrabban sárgásbarna, de vörösesbarna és fekete árnyalatok is léteznek. A foltok a fejen és nyakon sötétbarna-fekete színűek és kisebbek, míg a törzsön nagyobbak és rosetta-alakúak. A szőrzet színe és az állat ivara között nincs összefüggés.

Fogképlete: $\frac{3131}{3121}$

3.1.3 Természetes élőhelye, előfordulása és életmódja

A jaguár természetes élőhelye az amerikai kontinens. Az Amerikai Egyesült Államok délnyugati területeitől és Mexikótól egészen Paraguay és Argentína északi területéig fordul elő. Az Amerikai Egyesült Államok területén jelenléte korlátozott, újabban Arizona, Új Mexikó és Texas területein észleltek egyedeket.

A jaguár általában magányos életmódot folytat, ez alól kivételt képez az utódait nevelő anya. Ennek ellentmond, hogy kis számban ugyan, de vannak feljegyzett megfigyelések együtt élő és vadászó jaguárokról. Természetben a nőstények territórium nagyjából 10 km², míg a hímeké 28-40 km² (Rabinowitz, Nottingham és Nottingham Jr., 1986). Főleg esőerdőkben él, és habár a sűrű erdőt részesíti előnyben, megtalálható más mocsaras területeken, vagy akár füves pusztákon is. A víz közelsége fontos meghatározó tényező a territórium kijelölésekor. A többi macskafélével ellentétben kifejezetten szeret úszni.

A jaguár a nap mintegy kétharmad részét aktív táplálékkereséssel és táplálkozással tölti. Opportunista ragadozónak tekinthető. Harapása erős, a páncélos hullóket páncéljuk átharapásával képes megölni, míg a krokodilok esetében azok koponyáját is meg tudja roppantani fogaiival. A vadonban gyakori táplálékállata többek között a capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), a kajmán (*Caiman crocodilus*, *C. yacare*), a pekarifélék (*Tayassu spp.*), a kilencöves armadillo (*Dasypus novemcinctus*) és az ormányosmedve (*Nasua nasua*) (AZA, 2016). Táplálkozásakor a jaguár napokig a zsákmány mellett maradhat, vagy magával viheti azt territóriumán belül. A táplálkozások között eltelt idő nagyban függ az elejtett táplálékállatok testméretétől.

3.1.4 Szaporodása és utódnevelése

A fogságban tartott nőstények 12-24 hónapos korban válnak ivaréretté, míg ez a hímek esetében 24-36 hónapos korban következik be. Állatkerti adatok szerint az első alom ellésekor a nőstények átlagos életkora 6,7 év (n=381), míg hímeknél az első sikeres fedezéskor az életkor átlagosan 5,9 év (n=101) (AZA, 2016).

Sadleir (1966) valamint Wildt és mtsai. (1979) egy-egy nőstény jaguár ivari ciklusát vizsgálták a londoni Zoological Society, illetve a texasi Gladis Porter állatkertekben. Kutatásuk alapul szolgál a jaguárról elérhető mai szaporodásbiológiai ismeretekhez. Sadleir 10 ösztruszciklust jegyzett fel, ahol az ösztrusz átlagos hossza 12,9 nap volt (hossztartománya: 6-17 nap), míg az ösztrusz ciklus átlagosan 42,6 napig tartott. Wildt tanulmányában novembertől augusztusig 7 ösztruszciklust említ, ahol az átlagos ösztrusz 12 napig tartott, míg az ösztrusz ciklus hossza 31 és 63 nap között változott, átlagban pedig 47,2 nap volt. A ködfoltos párducokkal ellentétben ebben a fajban spontán ovuláció nem volt megfigyelhető (Brown és Wildt, 1997). Az ösztrusz jelenlétére ivarzási tünetek utalnak, mint például a lordosis, flehmen-reakció, vokalizáció, hempergőzés vagy a jelölővizelések megnövekedett mennyisége. A nőstény megnövekedett érdeklődést mutat a hím iránt, megnő a nem-agresszív fizikai érintkezés, valamint a kölcsönös ápolás mennyisége.

A vemhesség átlagos hossza 91-111 nap. A kölykök megszületése után a nőstény nem tolerálja a hím jelenlétét, mivel az a kölyköket támadja, vagy akár megölheti és meg is eheti azokat. Fogságban az egyébként együtt tartott állatok esetében sem kerülhet vissza a hím a nősténnyel közös kifutóba az utódok elválasztásáig. A kölykök általában 1,5-2 éves korban válnak külön anyjuktól.

3.1.5 Fajmegőrzés

A ma élő 36 vadmacskafajból 23 fenyegetett vagy veszélyeztetett státuszban van természetes elterjedési területének legalább egy részén. A jaguár az IUCN Vörös Listáján jelenleg a „Mérsékelten fenyegetett faj” besorolás alá esik. Azok a taxonok sorolhatók ide, melyek az élőhely és populációdinamikai vizsgálatok alapján nem sorolhatók a „Súlyosan veszélyeztetett”, a „Veszélyeztetett”, a „Sebezhető” valamint a „Nem fenyegetett” kategóriák egyikébe sem, de a vizsgálatok adatai arra utalnak, hogy a közeljövőben feltételezhetően meg fognak felelni ezen kritériumoknak (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 2008).

A populáció csökkenésének fő okai az erdőirtások, a természetes élőhelyek megsemmisülése, illetve széttagolódása, valamint az ember-állat konfliktusok. *In situ* és *ex situ* természetvédelmi erőfeszítések egyaránt szükségesek ezen fajok kihalásának elkerülése érdekében. A jaguár természetes élőhelyeinek megőrzésére készítette el a Panthera non-profit szervezet a Jaguar Corridor Initiative-t, amelynek célja a fragmentált élőhelyek összekötése és megőrzése Mexikótól Argentínáig, ezzel segítve a faj genetikai integritásának megőrzését, és elősegítve annak fennmaradását. Továbbá nemzetközi oktatási programok indultak, a helyi szakemberek továbbképzését és ezáltal az *in situ* kutatások fejlesztését tűzve ki célul (Swanson és Brown, 2004). A jaguár a Washingtoni Egyezmény (CITES) I. függelékébe sorolt fajok közé tartozik. Az I. függelék a legveszélyeztetettebb állatok és növények védelmére készült, és tiltja ezen fajok nemzetközi kereskedelmét, kivéve azon esetekben, amikor a szállítás háttérben nem kereskedelmi tevékenység áll, hanem például tudományos kutatómunka. A jaguár vadászata természetes élőhelyén tiltott, de az orvvadászat nagy mértékben fenyegeti az állatállományt, valamint a helyi gazdákkal fennálló konfliktusok miatt is még mindig számos állat veszíti életét.

Az *ex situ* fajmegőrzési törekvések egyike a fogságban tartott populációk méretének növelése. A jaguár a vadmacskafélék közül közepesen jól szaporodik fogságban, de a tartási viszonyok és az állatok egymáshoz való viszonyulásának optimalizálásán nagyon sok múlik. Ez utóbbihoz segítséget nyújt a nőstény állatok ivari ciklusának ismerete, amely szükség esetén egy mesterséges megtermékenyítéshez is jó alapot adhat. Ismereteink szerint jaguárban még nem történt sikeres mesterséges megtermékenyítés. Az ivari ciklus feltérképezése az ivari hormonok szintjének és változásainak végigkövetése révén lehetséges.

3.2 Hormonanalízis

3.2.1 A hormonmérés mintái

Az endokrinológiai vizsgálatokhoz sokáig a vérminták használata volt az egyértelmű választás. Mivel a hormonok nagy része a transzport folyamatokhoz a vérkeringést veszi igénybe, így a vér optimális közeget nyújt a vizsgált állatban lezajló endokrinológiai változások megítélésére. Ez a módszer jól működik házi- és laboratóriumi állatok, valamint emberek esetében, ellenben kevésbé előnyös vad és állatkerti állatok vizsgálatánál. A vadállatokból történő vérvételhez sokszor fizikai vagy kémiai megfélemezés

szükséges, mely az állat lehetséges egészségkárosodása mellett az eredményeket is negatívan befolyásolhatja (Kersey és Dehnhard, 2014). Mivel általában nem csak egy alkalmi mintavételről van szó, az állat sokszorosan ki van téve a vérvétel okozta stressznek és kockázatnak, valamint a stressz-indukálta mellékvese eredetű hormonválasz módosíthatja is a reprodukív hormonok leadását és működését, ezzel fals értékeket eredményezve (Moberg, 1985). Továbbá a vérvételhez eszközök és képzett szakemberek szükségesek, ezzel sok helyen limitálva a mintagyűjtés lehetőségét.

Endokrinológiai vizsgálatok végezhetőek továbbá a nyálból, ahol számos szteroid és peptid hormon megtalálható változatlan formában (Gröschl, 2008). Mivel azonban a minták beszerzése vagy a kicsöppenő nyál összegyűjtésével, vagy a szájüreg belsejéből mintavételi tampon segítségével történhet, vadállatokban ez a módszer sem alkalmazható korlátozások nélkül. Ez igaz a szőrmintából történő hormonvizsgálatokra is.

A hormonok metabolizmusuk során inaktiválódnak és kiválasztódnak. Zsíroldékony hormonok (pl. szteroidok, prosztaglandinok stb.) gyakran konjugálódnak a májban, majd kiválasztódnak a bélsárban és vizeletben (Palme, 2005). Továbbá peptid hormonok a vese glomerulusán átszűrve kiválasztódhatnak a vizeletben is (Kersey és Dehnhard, 2014). Mivel a kiválasztás mértéke arányos a vérben keringő hormonszinttel, az excretumokból nyert értékekből következtethetünk a szervezet hormonális állapotára. A kiválasztott hormonok közül a szteroidok vannak jelen a legnagyobb mennyiségben és ezek a legellenállóbbak a bomlással szemben. A vizelet és bélsár felhasználása endokrin vizsgálatokban nagy mértékben szélesítette a szaporodásbiológiai szempontból vizsgálható fajok skáláját (Lasley és Kirkpatrick, 1991; Schwarzenberger és *mtsai.*, 1996; Brown, 2006; Schwarzenberger és Brown, 2013). A minták gyűjtése, különösen a bélsár esetében könnyen és költségtakarékosan megoldható fogságban tartott vadállatok esetében. *In situ* természetvédelmi és fajmegőrzési programok esetében az egyedi azonosítás ugyan nehézkes, de ez a módszer sikerebben alkalmazható, mint a vérvizsgálat.

Házimacskában (*Felis catus*) majdnem az összes reprodukív szteroid hormon a bélsárban kerül kiválasztásra (Shille és *mtsai.*, 1990; Brown és *mtsai.*, 1994), így vadmacskák esetében is a bélsárvizsgálat számít az elsődleges módszernek.

3.2.2 Hormonmérési módszerek

Hormonkoncentrációk mérésére immunoassay módszerek használatosak. Az immunoassay működési elve az antigén, azaz a vizsgálandó molekula (pl. szteroid) és ugyanazon antigén jelölt formája közötti, az antitesthez való kötődésért történő

kompetíción alapul. A jelölés történhet radioaktív izotóp (RIA), enzim (EIA) vagy luminophor anyag (CLIA) segítségével. A RIA vizsgálatok számos előnnyel rendelkeznek, pl. a vizsgálatok könnyen megismételhetők, precízek és a kettek ára viszonylag olcsó. Ellenben nagy hátrányuk, hogy használatuk során radioaktív anyagokat kell használni, tárolni és megsemmisíteni, ami a jelentős kockázati tényezők mellett számos plusz intézkedést és engedélyt von maga után a használó intézmény számára (Graham és *mtsai.*, 2001; Kersey és Dehnhard, 2014). Az elérhető EIA kettek számában az elmúlt évtizedekben hatalmas növekedés következett be, és egyre inkább átveszik a radioaktivitáson alapuló vizsgálatok szerepét az endokrinológiai kutatásokban. A CLIA módszer előnye, hogy nagyobb szenzitivitású, mint a konvencionális kolorimetriás módszerek, és nem igényel hosszú inkubációs időket, valamint leállító reagens használatát sem, ellentétben pl. az EIA-val. Ellenben a jelenleg elérhető CLIA kettek a hormonok vérben keringő formájára vannak optimalizálva és az excretumban található metabolitok kimutatására nem alkalmasak (Kersey és Dehnhard, 2014). Habár a CLIA, specificitása miatt, idővel biztosan szélesebb körben lesz használatos, mint más immunoassayk, ez csak akkor válik elképzelhetővé, ha olyan csoport-specifikus antitestekre optimalizálnak, melyek több, szerkezetileg hasonló szteroid felismerésére képesek (Möstl, Rettenbacher és Palme, 2005).

3.2.3 *Hormonok*

A Felidae család számos fájában végzett endokrinológiai vizsgálatok arra engednek következtetni, hogy bár az ivari hormonok metabolizmusának jellegzetességei evolúciósan megtartottak a taxonon belül, a hormonok koncentrációja és kiválasztási jellegzetességei sokkal inkább fajspecifikusak (Brown, 2006).

3.2.3.1 *Ösztrogének*

Az ösztrogénszteroidok a 18 szénatomot tartalmazó ösztránvázból álló vegyületek csoportjába tartoznak. Női nemi hormonok, melyek termeléséért az ovarium theca interna és granulosa sejtjei és kis részben a mellévesekéreg felelős (Frenyó és Rudas, 1995). Szintézisének előanyaga a koleszterin, melyből több lépésen át androsztendion, majd ösztradiol, ösztriol és ösztron keletkezik. Hatásai többek között a méhnyálkahártya proliferációja és előkészítése a pete beágyazódására, valamint a nyakcsatornában híg váladék képződésének serkentése, mely megkönnyíti a spermiumok mozgását.

Az ösztrogének koncentrációjának mérése bélsármintákból fontos összetevője vadmacska fajokban is a ösztrusz ciklus monitorozásának. A metabolitok megoszlása hasonló az összes vizsgált Felidae fajban, habár a kiválasztott mennyiségben jelentős eltéréseket találtak. Az ocelot (*Leopardus pardalis*), tigrismacska (*Leopardus tigrinus*), hosszúfarkú macska (*Leopardus wiedi*), pusztai macska (*Otocolobus manul*) és halászmacska (*Prionailurus viverrinus*) esetében az átlagos értékek magasabbak voltak: alapértékek >60 ng/g, csúcsok >800 ng/g; míg gepárd (*Acinonyx jubatus*), ködfoltos párduc (*Neofelis nebulosa*) és a *Panthera* fajok vizsgált képviselői esetében az értékek jóval alacsonyabbak voltak: alapértékek <50 ng/g, csúcsok <500 ng/g (Brown és mtsai., 1995, 1996; Moreira és mtsai., 2001; Young és mtsai., 2004; Brown, 2006). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a testméretük szerinti besorolás alapján „kis” vadmacska fajok magasabb ösztrogén metabolit koncentrációkkal rendelkeznek. Ismereteink szerint ösztrogén koncentráció mérésére az ivari ciklus végigkövetése céljából jaguárban még nem volt kísérlet.

3.2.3.2 Progeszteron

A progeszteron a szexuálszteroidok csoportjába tartozó hormon. Szintézisének előanyaga a koleszterin, mely koleszterinészter formájában nagy mennyiségben tárolódik a sejtekben a szintéziséhez szükséges C-vitaminnal együtt. A progeszteront az ovarium theca-, granulosa- és luteinizált sejtjei termelik. A koleszterinből a mitokondriumban a dezmoláz enzim hatására pregnenolon képződik, amiből aztán az endoplazmatikus retikulum microsoma-frakcióiban kialakul a progeszteron. A vérben SHBG-hez kötötten szállítódik, majd a májban metabolizálódik és az excretummal ürül a szervezetből (Frenyó és Rudas, 1995). A progeszteron felelős a vemhesség fenntartásáért annak kezdeti szakaszán, a méhizomzatban antiösztrogén hatást fejt ki, az emlőben pedig a mirigyállomány fejlődését segíti.

A bélsárban mért progesztagén koncentrációk az ösztrogén metabolitokéhoz hasonlóan a fajok között nagy változatosságot mutatnak. A mért csúcsértékek 30-300 µg/g koncentráció között változnak a ködfoltos párduc (*Neofelis nebulosa*), gepárd (*Acinonyx jubatus*), tigris (*Panthera tigris*) és pusztai macska (*Otocolobus manul*) esetében, míg a leopárdmacska (*Prionailurus bengalensis*) esetében a csúcsértékek meghaladták a 2000µg/g koncentrációt (Brown és mtsai., 1994, 1995; Moreira és mtsai., 2001; Brown, 2006).

Az 5α -pregnan- 3α -ol-20-on az egyik domináns progeszteron metabolit a nagymacskák bélsarában. Jaguárban Umapathy és *mtsai.* (2013) mérte az 5α -pregnan- 3α -ol-20-on koncentrációját bélsármintákban. A vemhes állatokban mért értékek 8000 ng/g és 26000 ng/g koncentrációk között mozogtak. Az általuk fejlesztett EIA alacsony keresztreaktivitást mutatott más metabolitokkal, így csak ezen metabolit értékéről van jaguár esetében publikált adat.

3.2.3.3 PGFM

Az eikoszanoidok (más néven zsírszerű antakoidok) 20 szénatom tartalmú szénhidrogének. Ide tartoznak a prosztaglandinok, tromboxánok, leukotriének és lipoxinok. A prosztaglandinokat A-I csoportokra osztjuk a ciklopentán gyűrűn lévő oxigén és kettős kötések száma szerint. Szintézisük előanyaga membránfoszfolipid, melyből először arachidonsav, majd a cikloxygenáz úton keresztül több lépésben $PGF_{2\alpha}$ keletkezik (Frenyó és Rudas, 1995). $PGF_{2\alpha}$ rövid félidővel rendelkezik a szervezetben, és metabolizáció után PGFM formájában ürül a vizeletben és bélsárban egyaránt.

A prosztaglandinok kis mérete és termelésének sokszor fajra specifikusan történő parakrin szabályozása megnehezítette a hormon biológiai potenciáljának meghatározását vadmacska fajokban. A hormon használatának fontossága az ibériai hiúz (*Lynx pardinus*) és az eurázsiai hiúz (*Lynx lynx*) esetében merült fel elsőként, ahol az ösztrogén és progeszteron metabolitok egyike sem alkalmas a vemhesség és álvemhesség elkülönítésére faji sajátosságok miatt. Itt a PGFM jó biológiai indikátornak bizonyult a vemhesség megállapítására (Kersey és Dehnhard, 2014). Ezt követő vizsgálatok alkalmával a PGFM koncentrációk mérése számos más Felidae faj, többek között a jaguár esetében is ígéretes eredményeket mutatott (Dehnhard és *mtsai.*, 2012, 2015; Dehnhard, Naidenko és Jewgenow, 2014).

4 Célkitűzések

Ezen kutatás célja az ARTIS Amsterdam Royal Zoo nőtény jaguárjának hormonális alapon történő vemhességdiagnosztikája progeszteron és PGFM hormonok szintjének mérésén keresztül. Az egyedi, állatkerti-szintű megfigyelések mellett célunk bővíteni a jaguárokról jelenleg elérhető hiányos szaporodásbiológiai ismereteket, és felmérni a vizsgálatokra jelenleg elérhető tesztek alkalmazhatóságát.

5 Módszerek

5.1 Vizsgálati alanyok

A kutatás vizsgálati alanyai az amszterdami állatkert nőstény és hím jaguárja. A 12 éves hím, Mowgli 2004. október 27-én született a franciaországi Zoo Parc de Beauval-ban (2. ábra). A 7 éves nőstény, Rica 2010. augusztus 29-én született a németországi Krefeld állatkertjében (3. ábra). Mindkét állat az emmeni Wildlife Adventure Zoo tulajdonából 2016. november 29-én érkezett az amszterdami állatkertbe.



2. ábra: Mowgli

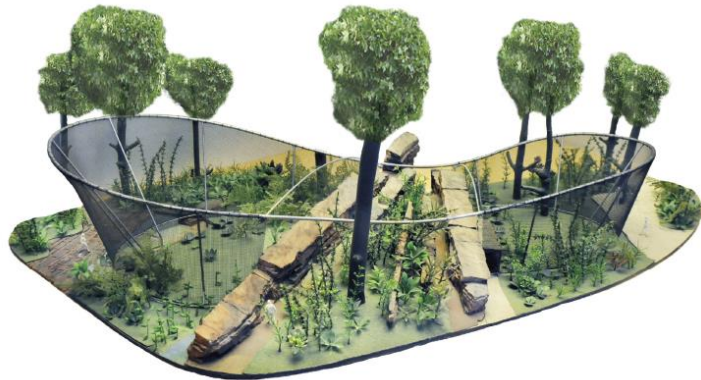


3. ábra: Rica

5.2 Ivarzási viselkedés-megfigyelés

Az amszterdami állatkertben a nőstény és hím jaguár az 4. ábrán megjelölt kifutóban van elhelyezve. A benti kifutó a közepén látható sziklaátjáró alatt található, három elkülöníthető ketrecre osztott belső részből és gondozói helységekből áll. A sziklalépcső elválasztja egymástól a két kifutót, de a látogatók számára megmászható, így még egy szögből rálátást nyújt az állatokra.

Az állatok a 2016. decemberi integrálódás során naponta cseréltek kinti kifutót, ezzel segítve a hellyel, valamint az egymás illatanyagaival való ismerkedést. A kinti kifutókban lévő állatok számára, a sziklalépcső miatt, nincs lehetőség egymás megfigyelésére, de egymás megismerése az auditorikus és olfaktorikus ingerek összegyűjtésével azonnal megkezdődött. A sikeres pároztatás elősegítése érdekében az AZA irányelveket követtük az állatok összeengedését illetően. Az összeengedés gondozói felügyelet mellett történt, szétválasztásukra bármikor készen állva, majd pozitív eredmények esetén az együtt töltött idő mennyisége napról napra nőtt. A viselkedés-megfigyelés kiterjedt az állatok egymáshoz való viszonyulására, az agresszió mértékére, Rica esetében az ivarzási tünetek jelenlétére, valamint párzási viselkedés meglétére.



4. ábra: Jaguárkifutó komplexum az amszterdami ARTIS állatkertben.

5.3 Bélsár- és vizeletgyűjtés

A bélsár és vizeletminták gyűjtésére a reggeli kifutó karbantartási munkák során került sor. Az állatok ez idő alatt az elkülönített külső kifutókban tartózkodtak. A vizelet gyűjtése a kifutó aljzatáról pipettával történt Vacutest vizeletgyűjtő csövekbe. A vizeletgyűjtés opportunisztikus jelleggel történt, a gyűjtés nehézsége a kis mintaszámban is tükröződik. A fellelhető bélsárminták dátummal ellátottan zacskókba kerültek (5. ábra). Mindkét mintatípus a gyűjtés utáni lehető legrövidebb időn belül lefagyasztásra került és a ghenti Állatorvostudományi Egyetem endokrinológiai laboratóriumába történő szállításig -20°C -on tárolódtak. -20°C -on tárolva a minták több hónapig, akár évig eltarthatók károsodás nélkül (Khan és mtsai., 2002; Palme és mtsai., 2013).



5. ábra: Bélsárminta felcímkézett zacskóban

5.4 Hormonszintmérés

A vizsgálatokhoz 8 darab bélsár-, és 3 darab vizeletmintát használtunk fel. A mintákból két hormon szintjét mértük: progeszteron és PGFM. A bélsárminták a viselkedési paraméterekkel összevetve három csoportba oszthatók. A bélsármintákból időrendben az első három minta – december 21., december 26., és január 6. –

feltételezhetően a normál ivari ciklus működésének egy-egy értékét mutatja, potenciálisan alapértéknek tekinthető, mivel e dátumoknál a vemhesség lehetősége teljességgel kizárható. Az időrendben negyedik és ötödik minták – április 5. és május 17. – esetében már fennáll egy esetleges korai vemhesség megléte, de ugyanakkor lehetnek álvemhes vagy normál ciklusos minták is. Az utolsó három minta – június 6., június 11., és június 18. – potenciálisan késő vemhességi fázisból származik, vagy normál ciklusos működést mutat, amennyiben nincs vemhesség.

A vizeletmintákat a bélsárminták kiegészítéseként vizsgáltuk. Az első minta (január 5.) az első csoportos bélsármintákkal esik egy megítélés alá, míg a másik két vizeletminta (június 8., június 10.) az utolsó csoport időpontjaival fésülhető össze.

5.4.1 Minta előkészítése

A minták felhasználás előtt egy minimum 24 órás fagyasztva-szárításon estek át. Ezzel értük el, hogy a vizsgálatokhoz szárazanyag-tartalmat vehessünk alapul, amely lehetővé teszi az inter- és intraciklusos megfigyelések összehasonlítását. A szárítás után a bélsármintákat megőröltük, és amennyire lehetséges volt, az emésztetlen szőr- és csontmaradványok eltávolításra kerültek. A bélsárminták esetében ezután a szteroid extrakció következett.

A vizeletmintákat műanyag tölcser segítségével egy pamut filteren átszűrtük 15 ml-es polipropilén laboratóriumi csövekbe. A vizeletminták esetében nincs szükség szteroid extrakciós lépésre, így ezeknél mintáknál az EIA következett.

5.4.2 Szteroid extrakció

200 mg tömegű örölt száraz bélsármintákat mértünk ki 15 ml-es polipropilén laboratóriumi csövekbe (6. ábra). Habár ránézésre némelyik cső tartalma nagyobb térfogatú, a kimért minták tömege minden csőben 200 mg bélsárminta volt.



6. ábra: 200 mg tömegű szárított bélsárminták.

Ezt követően a mintákhoz 2 ml ethanol adtunk, majd a csöveket 30 percig rázattuk, amit 15 perc centrifugálás követett percenkénti 5000 fordulatszámon (rpm). A centrifugálás után a csövekből egyenként 1 ml felülúszót átpipettáztunk egy másik laboratóriumi csöbe, melyet szárítás követett. Majd 100 µl ethanol adtunk a mintához, amit vortex-keverő segítségével elkevertünk. Ezt 400 µl assay puffer hozzáadása követte, ismételt vortex-keveréssel, és utána 5 perc nyugalmi időszakkal. A vortexezés és az azt követő 5 perces periódus még kétszer került megismétlésre. Ezután az EIA következett.

5.4.3 EIA

5.4.3.1 Progeszteron

A progeszteron szint mérése a DetectX® Progesterone Enzyme Immunoassay Kit (K025-H1, Arbor Assays™, Ann Arbor, Michigan, USA) használatával történt. A kit az 1. táblázatban leírt összetevőket tartalmazza. A minta felhígítása előtt a kitt-specifikus reagensek elkészítésre kerültek.

| Tétel | Mennyiség | Megjegyzés |
|----------------------------------|-----------|--|
| Microtiter lemez | 1 darab | 96 mélyedésű |
| Progeszteron standard | 125 µl | speciális stabilizáló oldatban |
| DetectX® progeszteron antitest | 3 ml | egér monoklonális progeszteronra specifikus antitest |
| DetectX® progeszteron konjugátum | 3 ml | progeszteron-peroxidáz konjugátum speciális stabilizáló oldatban |
| Koncentrált assay puffer | 28 ml | alkalmazáskor deionizált vagy desztillált vízzel ötszörösére hígítandó |
| Koncentrált mosófolyadék | 30 ml | alkalmazáskor deionizált vagy desztillált vízzel húszszorosára hígítandó |
| TMB szubsztrát | 11 ml | |
| Leállító oldat | 5 ml | 1M sósav oldat |
| Microtiter lemez lezáró | 1 db | |

1. táblázat. A DetectX® Progesterone Enzyme Immunoassay Kit összetevői.

A vizeletminták hígítása 1:10 arányban történt, ellenben a bélsárminták hígításához nem állt rendelkezésre korábbi optimális hígítási arány. A potenciális hígítási faktorok kiválasztása a más vadmacska fajok irodalmi értékei alapján történt. Referenciaként a

ködfoltos párduc (*Neofelis nebulosa*) értékeit használtuk fel, melyek progesztagénekre a 100-400 µg/g sávban mozogtak (Brown és *mtsai.*, 1995; Brown, 2006). Az értékek tükrében három hígítási arányt választottunk: 1:8 arányú hígítást (aminek tartományon kívül kellett esnie várakozásaink szerint), az 1:800 arányú hígítást (ami progeszteron alapértékeket hivatott képviselni) és 1:80000 arányú hígítást (ami megfelelő lehet luteális fázisú/álvemhes/vemhes progeszteron értékek detektálására).

Minden microtiter lemezen alkalmaztunk negatív kontroll mélyedéseket, a nem-specifikus kötődés (NSB) kiszűrésére, valamint pozitív kontroll mélyedéseket (maximum binding wells, B₀). A kettő protokoll részletes leírását a 2. táblázat tartalmazza.

| Lépés | Munkamenet | Mennyiség vagy idő | Megjegyzés |
|-------|----------------------------------|--------------------|--|
| 1. | minta vagy standard hozzáadása | 50 µl | minden mélyedésbe |
| 2. | assay puffer hozzáadása | 75 µl | negatív kontroll mélyedésbe |
| 3. | assay puffer hozzáadása | 50 µl | pozitív kontroll mélyedésbe |
| 4. | DetectX® progeszteron konjugátum | 25 µl | minden mélyedésbe |
| 5. | DetectX® progeszteron antitest | 25 µl | minden mélyedésbe, kivéve negatív kontroll |
| 6. | lemezlezáró felhelyezése | | |
| 7. | rázás szobahőmérsékleten | 2 óra | hibás rázás 45%-kal csökkenti a kötődés mértékét |
| 8. | öblítés mosófolyadékkal | 300 µl | minden mélyedést négyszer átöblíteni |
| 9. | szárítás törlőkendővel | | |
| 10. | TMB szubsztrát hozzáadása | 100 | minden mélyedésbe |
| 11. | inkubáció szobahőmérsékleten | 30 perc | rázás nélkül |
| 12. | leállító folyadék hozzáadása | 50 µl | minden mélyedésbe |

2. táblázat: DetectX® Progeszteron EIA Kit protokoll menete.

A folyamat leállítása után a Emax Plus Microplate Reader ((Molecular Devices, LCC, Sunnyvale, California, USA)) lemezolvasóval leolvastuk az egyes minták optikai denzitását 450 nm hullámhosszon. Majd az $\% B/B_0 = 100 * [(OD_{standard} - OD_{NSB}) / (OD_{B_0} - OD_{NSB})]$ egyenlet kiszámítása után (SoftMaxPro Software, version 6.4.1, Molecular

Devices, LCC, Sunnyvale, California, USA) a 4 PLC használatával megalkottuk a standard görbét. Az % B/B₀ görbe alapján megkapott koncentrációkat megszorozva a hígítási faktoral kaptuk a minták hormonszint értékeit.

A kitt keresztreaktivitási értékei a következők: progeszteron (100%), 3β-hydroxy-progeszteron (172%), 3α-hydroxy-progeszteron (188%), 11β-hydroxy-progeszteron (2,7%), 11α-hydroxy-progeszteron (147%), 5α-dihydroprogeszteron (7,0%) és pregnanolon (5,9%).

5.4.3.2 PGFM

A PGFM mérésére a DetectX® 13,14-dihydro-15-keto-PGF2α (PGFM) Enzyme Immunoassay Kitet (K022-H1, Arbor Assays™, Ann Arbor, Michigan, USA) használtuk. A kitt elsődlegesen hiúzokon lett kifejlesztve, de azóta számos más vadmacska fajban ígéretes eredményeket mutatott. A kitt a 3. táblázatban leírt összetevőket tartalmazza.

| Tétel | Mennyiség | Megjegyzés |
|--------------------------|-----------|--|
| Microtiter lemez | 1 darab | 96 mélyedésű |
| PGFM standard | 125 µl | speciális stabilizáló oldatban |
| DetectX® PGFM antitest | 3 ml | nyúl poliklonális PGFMre specifikus antitest |
| DetectX® PGFM konjugátum | 3 ml | speciális stabilizáló oldatban |
| Koncentrált assay puffer | 28 ml | alkalmazáskor deionizált vagy desztillált vízzel ötszörösére hígítandó |
| Koncentrált mosófolyadék | 30 ml | alkalmazáskor deionizált vagy desztillált vízzel húszszorosára hígítandó |
| TMB szubsztrát | 11 ml | |
| Leállító oldat | 5 ml | 1M sósav oldat |
| Microtiter lemez lezáró | 1 db | |

3. táblázat: a DetectX® 13,14-dihydro-15-keto-PGF2α (PGFM) Enzyme Immunoassay Kit összetevői.

A vizeletminták hígítása ez esetben is 1:10 arányban történt. A bélsárminták esetében a Dehnhard és mtsai. (2015) eredmények alapján 1:8 és 1:800 hígítási arányokkal dolgoztunk; előbbieket az alapértékeket, míg az utóbbiak a vemhességi hormonszintet célozták meg.

A protokoll részletes leírása a 4. táblázatban található.

| Lépés | Munkamenet | Mennyiség vagy idő | Megjegyzés |
|-------|--------------------------------|-----------------------|---|
| 1. | minta vagy standard hozzáadása | 50 µl | minden mélyedésbe |
| 2. | assay puffer hozzáadása | 75 µl | negatív kontroll mélyedésbe |
| 3. | assay puffer hozzáadása | 50 µl | pozitív kontroll mélyedésbe |
| 4. | DetectX® PGFM konjugátum | 25 µl | minden mélyedésbe |
| 5. | DetectX® PGFM antitest | 25 µl | minden mélyedésbe, kivéve negatív kontroll |
| 6. | Lemezlezáró felhelyezése | | |
| 7. | Rázás szobahőmérsékleten | 1 óra | hibás rázás 45%-kal csökkenti a kötődés mértékét |
| 8. | öblítés mosófolyadékkal | 300 µl | minden mélyedést négyszer átöblíteni |
| 9. | szárítás törülközővel | | minden mélyedésbe |
| 10. | TMB szubsztrát hozzáadása | 100 µl | minden mélyedésbe |
| 11. | inkubáció szobahőmérsékleten | 30 perc | rázás nélkül |
| 12. | leállító folyadék hozzáadása | 50 µl | minden mélyedésbe |

4. táblázat: DetectX® 13,14-dihydro-15-keto-PGF_{2α} (PGFM) EIA Kit protokoll menete.

A folyamat leállítása után a progeszteron mérésnél már részletezett módon lemértük a minták optikai sűrűségét 450 nm hullámhosszon és kiszámoltuk a mintákban jelenlévő PGFM koncentrációt.

A kitt keresztreaktivitási értékei az alábbiak: PGFM 100%, PGEM 1,5%. Az anyamolekula (PGF_{2α}), valamint más metabolitok, például a tetranor-PGFM és a 11β-PGF_{2α} esetében a keresztreaktivitás már 0%.

6 Eredmények

6.1 Viselkedés-megfigyelés

Az állatok 2016. november 29-én érkeztek az állatkertbe. Az első két hét a kifutókkal történő ismerkedéssel telt, majd az állatok az AZA irányelv (AZA, 2016) betartása mellett közös kifutóba kerültek. Megfigyeléseinket az 5. táblázat tartalmazza.

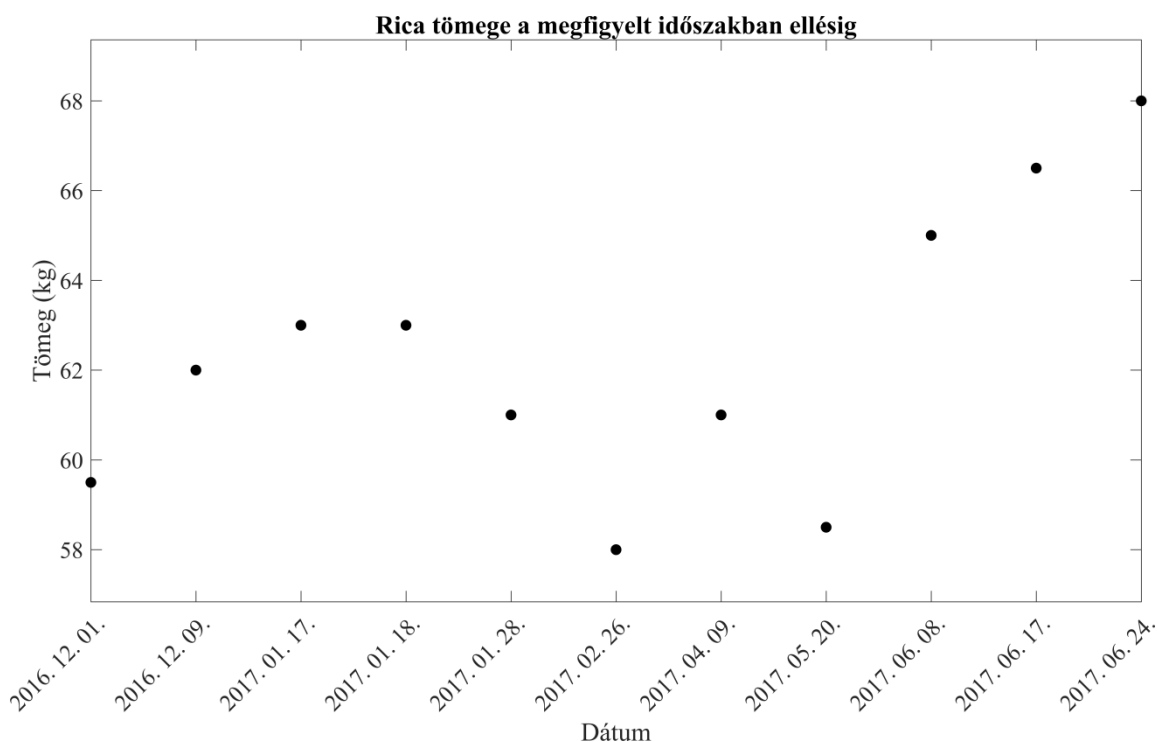
| Dátum | Kifutóban együtt töltött idő | Ivarzási tünetek | Kopuláció | Megjegyzések |
|-----------------|------------------------------|------------------|---------------|--|
| 2016.12.16. | pár perc | nincsenek | nincs | első próbálkozás, mindkét állat agresszív |
| 2016.12.28. | 10 perc | nincsenek | nincs | kifejezett interakció nincs |
| 2016.12.29. | 14 perc | nincsenek | nincs | Mowgli agresszív - szétválasztás |
| 2017.01.02. | 1 óra | nincsenek | nincs | Mowgli udvarolna, de Rica nem fogékony |
| 2017.01.04. | 2 óra | nincsenek | nincs | Mowgli udvarolna, de Rica nem fogékony |
| 2017.01.05. | 2 óra | nincsenek | nincs | mint előző napokban, de agresszívabb viselkedés |
| 2017.01.09.-10. | nappal | vannak | próbálkozások | éjszakára még elkülönítve |
| 2017.01.11.-18. | egész nap | vannak | van | többszöri kopuláció |
| 2017.01.19. | 1 óra | nincsenek | nincs | agresszív viselkedés, kisebb sérülések |
| 2017.02.16. | teljes délután | nincsenek | nincs | nincs interakció |
| 2017.02.17. | teljes délelőtt | nincsenek | nincs | Mowgli udvarolna, de Rica nem fogékony, agresszívvá válik |
| 2017.02.20. | pár perc | nincsenek | nincs | nagy mértékű agresszió |
| 2017.03.12. | nincs | vannak | nincs | egész nap kölcsönös vokalizáció |
| 2017.03.13.-14. | egész nap | vannak | van | többszöri kopuláció |
| 2017.03.15.-19. | egész nap | vannak | nincs | megfigyelt kopuláció nincs |
| 2017.03.20. | pár óra | nincsenek | nincs | megnövekedett agresszió, szétválasztás |
| 2017.04.20-23. | egész nap | nincsenek | nincs | nincs interakció, moderált agresszió, 04.23. szétválasztás |

5. táblázat. A jaguárok viselkedésének megfigyelése, tekintettel az agresszió mértékére, az ivarzási tünetek és párzási viselkedés meglétére.

Az eredményekből kitűnik, hogy a kezdeti időkből az egymás iránti teljes közömbösség és kifejezett agresszió váltotta egymást. Agresszív viselkedés esetén az állatok a nap hátralevő részére szétválasztásra kerültek. Rica ivarzási tüneteket első alkalommal január 9-én mutatott. Ekkor jelentősen többet hempergett, valamint megnőtt a vokalizáció mértéke és a jelölések sűrűsége is. Mowgli jelenlétére és közeledésére fogékony volt, és pár nap összeszokás után többször is ígéretesnek tűnő párzási viselkedést mutattak. Rica januárban 10 napig mutatott ivarzási tüneteket. Az ivarzási tünetek következő megjelenése március 12-én következett be. Ez nagyjából 62 nap hosszú ösztroz ciklusra enged következtetni. Márciusban az ösztroz hossza ivarzási tünetek megléte alapján nagyjából 8 napra tehető.

A márciusi ösztrozt és kopulációt követően áprilisban, májusban, illetve júniusban Rica nem mutatott ivarzási tüneteket. Az eredménytelen áprilisi összeengedés után újabb összeengedés nem történt.

Rica rendszeres testtömeg-méréseken esett át (7. ábra); a kezdeti időszakban havonta többször, majd március kivételével havonta. Testtömege május közepén 58,5 kg volt, míg június 8-án, nem egész három héttel később, már 65,0 kg. Az egyértelmű, nagymértékű testtömeggyarapodás, valamint az ivarzási tünetek megjelenésének elmaradása vemhességre engedett következtetni.



7. ábra: Rica testtömegváltozásai a kifutó elfoglalásának időpontjától június 24-ig.

Rica június 27-én visszavonult benti kifutójába, és fekvé töltötte a nap nagy részét. Majd június 28-án 00:24-kor egy, majd 04:31-kor még egy kölyöknek adott életet. Az ellés és a kölykök elfogadása is komplikációmentesen lezajlott. Az utolsó márciusi megfigyelt kopuláció (március 13.) és az ellés (június 28.) között 107 nap telt el. Mivel nem jelenthető ki biztosan, hogy március 14. és 19. között további kopuláció nem történt, így a vemhesség időtartama 101-107 nap. A kölykök szexálására 1 hónapos korukban került sor, egy nőstény és egy hím állattal gyarapodott az állatkert állománya. (8. ábra).



8. ábra: Három hetes jaguárkölykök

6.2 Hormonanalízis

A bélsár- és vizeletmintákból nyert progeszteron és PGFM koncentrációkat a 6. és 7. táblázatok foglalják össze.

| Mintagyűjtés dátuma | Progeszteron ($\mu\text{g/g}$) | PGFM (ng/g) |
|---------------------|----------------------------------|------------------------|
| 2016.12.21. | 5,9 | 68,91 |
| 2016.12.26. | 0,76 | 31,87 |
| 2017.01.06. | 0,27 | 63,18 |
| 2017.04.05. | 7,76 | 84,28 |
| 2017.05.17. | 0,28 | 43,12 |
| 2017.06.06. | 9,61 | 65,41 |
| 2017.06.11. | 2,76 | 18,11 |
| 2017.06.18. | 2,59 | 34,26 |

6. táblázat: A vizsgált bélsármintákból mért progeszteron és PGFM értékek. A progeszteron $\mu\text{g/g}$, a PGFM pedig ng/g koncentrációban volt mérhető a mintákban.

| Mintagyűjtés dátuma | Progeszteron (ng/ml) | PGFM (ng/ml) |
|---------------------|----------------------|--------------|
| 2017.01.05. | 5 | 10,96 |
| 2017.06.08. | 3,87 | 13,97 |
| 2017.06.10. | 57,56 | 52,63 |

7. táblázat: A vizsgált vizeletmintákból mért progeszteron és PGFM értékek. A progeszteron és a PGFM hormonok egyaránt ng/ml koncentrációban voltak jelen a mintákban.

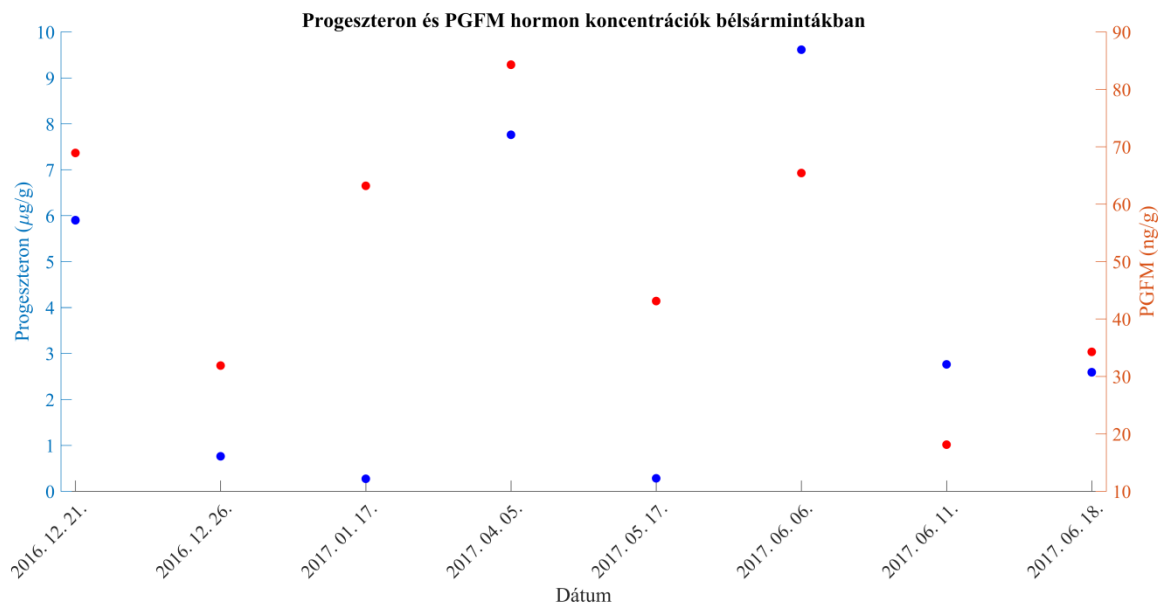
6.2.1 Progeszteron

A bélsárban mért progeszteron értékek $\mu\text{g/g}$, míg a vizeletmintákban ng/ml koncentrációban voltak mérhetőek. A bélsármintáknál alkalmazott 1:8, 1:800 és 1:80000 hígítási arányokból csak az 1:800 hígítású mintákból származó értékek feleltek meg a kalibrációs görbéneknek. A bélsárból mért progeszteron értékek közül legalacsonyabb 0,27 $\mu\text{g/g}$, míg a legmagasabb 9,61 $\mu\text{g/g}$ volt. A vizeletmintákban mért koncentrációk a bélsárban mért értékeknél jelentősen kisebbek voltak. Ez alátámasztja azokat a korábbi megfigyeléseket, miszerint macskafélékben a szteroidhormonok kiválasztása csak kis arányban történik a vizelettel (Brown, 2006). A május 17-i mintában mért jelentős koncentrációcsökkenés eddigi faji szaporodásbiológiai ismereteinktől eltérő eredményt ad. Habár a kétféle minta gyűjtési dátumai nem megegyezőek, a bélsárban június 6-ról június 11-re megfigyelt változás iránya ellentmond a vizeletben június 8-ról június 10-re történt változásnak.

6.2.2 PGFM

A bélsármintákban a PGFM koncentrációk ng/g, míg a vizeletben ng/ml koncentrációban voltak mérhetőek. Az alkalmazott 1:8 és 1:800 hígítások közül csupán az előbbi felelt meg a kalibrációs értékeknek. A bélsármintákban a legalacsonyabb mért koncentráció 18,11 ng/g, a legmagasabb pedig 84,28 ng/g volt. A nem-vevhes téli kontrollmintákban mért legmagasabb koncentráció 68,91 ng/g volt, ez az összes mért érték közül a második legnagyobb. A vemhesség ideje alatt az első vemhességi mintától számítva a többi mintában a PGFM szintje hullámzó módon, de folyamatosan csökkent. Ezzel ellentétesen a vizeletben mért három érték növekvő tendenciát mutatott, habár a jelentős mértékű növekedés a késői vemhességi fázisban 13,97 ng/g koncentrációról 52,63 ng/g-ra két nap alatt következett be.

A 9. ábra mutatja bélsármintákban mért progeszteron és PGFM értékek egymáshoz viszonyított alakulását. A grafikon két y-tengelyén ábrázolt két hormon mennyisége különböző koncentráció mértékegységekben van feltüntetve. A grafikon célja a hormonok egymáshoz viszonyított tendenciájának ábrázolása. A megfigyelt időpontok többségében a progeszteron és PGFM értékek ugyanolyan irányvonalat követve változnak. A vemhesség időtartama alatt mindkét hormon koncentrációi várakozásainktól eltérő, hullámzó-csökkenő tendenciát mutatnak.



9. ábra: A bélsármintákban mért hormonkoncentrációk. Az bal oldali kék y-tengelyhez a kék pontokkal µg/g-ban kifejezett progeszteron koncentrációk tartoznak, míg a jobb oldali piros y-tengelyhez a piros pontokkal ng/g mértékegységben ábrázolt PGFM koncentrációk társulnak. A grafikon jól ábrázolja a két hormon egymáshoz viszonyított változásait.

7 Megbeszélés (következtetések)

Kutatásunk során az amszterdami állatkert nőtény jaguárjának ivarzási viselkedését figyeltük meg, valamint vizsgáltuk a progeszteron és PGFM hormon koncentrációkat az ivari ciklus és vemhesség különböző fázisaiban gyűjtött vizelet- és bélsármintákból. Megfigyeléseink egy része követte elvárásainkat, tovább erősítve az elérhető irodalmi adatokat. Ezzel szemben a hormonális vizsgálatunk eredményei több szempontból is ellentmondanak a korábbi vizsgálatokban mért értékeknek és tendenciáknak.

A Rica által mutatott ivarzási viselkedés és tünetek: hempergés, vokalizáció és megnövekedett jelölővizelések mennyisége egyezik a vadmacskákról eddig birtokunkban lévő ismeretekkel (Stehlik, 1971; Wildt, Brown és Swanson, 1998). Januárban az ivarzási tünetek jelenléte alapján megállapított ösztrusz 10, márciusban 8 nap hosszú volt, míg az ösztrusz ciklus hossza hozzávetőlegesen 62 nap volt. Ezek az értékek beilleszthetők a Sadleir és Wildt által megalkotott képbe: előbbinél az ösztrusz hossza 6-17 nap között változott, míg az utóbbi vizsgálatnál az átlagos érték 12 nap volt. Míg a ciklushosszok mindkettő esetben átlagosan 42 illetve 47 nap körül mozogtak, Wildt említést tesz 63 napos ciklusról is (Sadleir, 1966; Wildt és *mtsai.*, 1979). Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy az ivari ciklus fázisainak hossza intraspecifikusan, sőt az egyén szintjén is nagy variabilitást mutat.

A vemhesség időtartamára több irodalmi forrás is rendelkezésre áll. Feljegyezték már 108 valamint 111 napos (Sadleir, 1966), 103 napos (Stehlik, 1971), és 98 napos (Umapathy és *mtsai.*, 2013) vemhességet is. Összességében 91 nap és 111 nap közötti hosszúságú gesztációs periódus elfogadottnak számít (Wildt, Brown és Swanson, 1998). Mivel a mi esetünkben az ovuláció és fogantatás pontos időpontja nem ismert, így a vemhesség hosszát 101-107 napban állapítottuk meg. Ez a vemhességi tartomány ebben a fajban élettaninak mondható.

Korábbi megfigyelések megállapítottak olyan eseteket, hogy a vemhesülést követően a következő (vagy akár következő kettő) ösztrusz még akadálytalanul megtörténhetett, és csupán a vemhesség utolsó harmadában tűnt el a ciklusos ivari viselkedés, ezzel is nehezítve a vemhesség detektálását (Wildt, Brown és Swanson, 1998). Kutatásunkban azt tapasztaltuk, hogy a vemhesülést követően már nem következett be a következő ivarzási tünetek megjelenése. Ennek egyik oka lehet, hogy Rica ösztrusz ciklusa kifejezetten hosszúnak mondható. Amennyiben ez a ciklushossz ebben az egyedben

következéskor ilyen hosszúságú, akkor a következő ösztrusz bekövetkezésekor Rica már majdnem a vemhesség harmadik harmadába lépett, amely előrehaladott állapotban a normális ciklusos működés már megszűnt.

Progeszteron koncentráció mérésére a vadmacska fajok nagy százalékában sor került már. Az ezekenél megállapított értékek, mint a már korábban is említettem, nagyon fajspecifikusak, így nem meglepő, hogy a jaguár esetében új értékek és tendenciák jelennek meg. A laboratóriumi munkánál a kitta használatok a ködfoltos párduc (*Neofelis nebulosa*) értékei alapján (300-400 µg/g) alakítottuk a hígítási arányokat (Brown és mtsai., 1995). A mintákból kinyert alacsony koncentrációk fényében a referenciaként használt faj (*Neofelis nebulosa*), mint választás, újraértékelendő. A ködfoltos párduc rendszertanilag nem a jaguár legközelebbi rokona, így köztük nagyobb evolúciós különbségek lehetnek. A szintén *Panthera* nemzetségbe tartozó tigris (*Panthera tigris*) vizsgálata során kisebb nagyságrendű, 60-100 µg/g progeszteron koncentrációkat mértek (Brown, 2006). Az általunk mért értékek maximuma nagyjából 10 µg/g, mely a Felidae család összes vizsgált fájában mért progeszteron koncentráció közül jelenleg a legalacsonyabb. A mért értékek ismeretében a módszer optimalizálása után érdemes lenne a koncentrációkat egy újabb kísérlet alkalmával újravizsgálni.

Az egyetlen progesztagénekhez köthető irodalmi adat jaguárban az 5α-pregnan-3α-ol-20-on vizsgálatára vonatkozik (Umapathy és mtsai., 2013). Az 5α-pregnan-3α-ol-20-on az egyik bélsárral kiválasztódó, domináns progeszteron metabolit (Schwarzenberger és mtsai., 1996; Umapathy és mtsai., 2007). A kutatók vizsgálatára saját EIA módszert fejlesztettek ki. Az eredmények azt mutatták, hogy a hormonkoncentráció a bélsárban a párzás utáni 12. naptól növekedett a párzás utáni 60. napig. Az ellés napjára (98. nap) a hormonszint visszacsökkent az ösztruszkor mért koncentrációra. Vemhes jaguárban 8,0 µg/g és 26 µg/g közötti 5α-pregnan-3α-ol-20-on értékeket mértek. A kutatásunkban használt kitta keresztreaktivitása a pregnanolonnal szemben csak 5,9 %, míg az Umapathy és mtsai. által használt EIA módszer nagyon specifikus volt a pregnanolra, és az általunk főleg vizsgált hydroxy-progeszteronokat nem vizsgálta. A két kutatás ezen okoknál fogva részletekbe menően nehezen összehasonlítható, de a konzisztensen alacsony progeszteron metabolit koncentrációk arra engednek következtetni, hogy a *Panthera* fajokban, és különösen a jaguárban ezek az alacsony koncentrációk élettaninak tekinthetőek. Ennek megerősítésére, valamint a progeszteron metabolitok bélsárban történő megoszlásának megállapítására további vizsgálatok szükségesek.

Eredményeinkben anomáliának számít még a május 17-i minta progeszteronkoncentrációja, mely egyike a legalacsonyabb mért koncentrációknak. Más vadmacska fajokban a progeszteron minimum a vemhesség kétharmadáig (vagy annak teljes hosszában) magas szinten marad (Wildt, Brown és Swanson, 1998; Brown, 2006). Esetünkben a vemhesség második harmadában a progeszteron lecsökkent 0,28 µg/g koncentrációra – mely a téli nem-vmehes értékek alapján alapértéknek tekinthető –, majd a harmadik harmadban visszaemelkedett 9,61 µg/g koncentrációra. Habár a progeszteroncsúcsok jelenléte más fajokban is jelen van, ilyen drasztikus koncentráció-csökkenés nem tapasztalható. További vizsgálatokkal szükséges elkülöníteni, hogy a tapasztalt változások ebben a fajban az élettani vemhességi hormonprofil részei, vagy valamilyen más okból előforduló egyszeri esetről van itt szó.

A kutatásunkban mért PGFM értékek nem követik az irodalmi értékeket, és nem erősítik meg a vemhesség tényét sem. A PGFM koncentráció mérése az elmúlt pár év új vemhességdiagnosztikai módszere, mely mára már számos vadmacska fajban mutatott ígéretes eredményeket. Jaguárban (n=2) a PGFM alapértékei a vemhesség első hat hetében 546-875 ng/g koncentrációk között változtak, amit a 7.-12. héten egy lassú emelkedés követett mely az ellés előtti hétben érte el maximumát: $5875 \pm 216,5$ ng/g koncentrációban (Dehnhard és mtsai., 2015). Kutatásunkban az összes mért PGFM koncentráció 100 ng/g alatt volt, a Dehnhard és mtsai által mért koncentrációkat meg sem közelítettük és eredményeink az emelkedő tendenciát sem követték. Laboratóriumi módszereink újrvizsgálása és a szerzővel történt személyes kommunikáció után sem tudtuk a különbséget okát egyértelműen feltárni. Véleményünk szerint feltétlenül szükséges az assayt egy nagyobb mintaszám igénybevételével megvizsgálni az értékek normalizálhatósága, és a fajspecifikus és egyedi különbségek azonosítása érdekében.

Dehnhard és mtsai (2015) cikkükben azt állították, hogy 1,5 µg/g küszöbérték elérése a vemhesség egyértelmű jele, és így PGFM mérésen keresztül néhány, vagy akár csak egyetlen minta segítségével a vemhesség ténye biztosan kimondható. Ezen megállapítás alapján esetünkben a vemhességi diagnózis: nem vemhes (tévesen), mivel a vemhesség alatti értékek nem különböznek nagyságrendileg a nem-vmehes koncentrációktól, és meg sem közelítik a kiírt küszöbértéket. Úgy gondoljuk, hogy jelen állapotában a PGFM kett csak fenntartásokkal alkalmazható jaguárok vemhességvizsgálatára.

Véleményünk szerint feltétlenül szükséges a *Panthera onca* faj ivari ciklusának teljes feltérképezése ösztrogén és progeszteron metabolitok vizsgálata által, hogy a

jövőben mind a pározttatás, mind az esetleges mesterséges megtermékenyítési technikák alkalmazása a faj szaporodásbiológiai tulajdonságaihoz optimalizálva történhessen. Kutatásunk demonstrálja a vemhességi hormonok longitudinális vizsgálatának szükségességét, annak érdekében, hogy a kiragadott időpontokkal ellentétben egy teljes, átfogó és könnyebben értelmezhető kép álljon a kutatók rendelkezésére. Úgy gondoljuk, hogy a bélsárminták vizsgálata ebben a fajban is a legegyszerűbben kivitelezhető, legköltséghatékonyabb és az állat szempontjából legoptimálisabb mintagyűjtési módszer a reprodukzív hormonok vizsgálatára, de a mintagyűjtés heti rendszerességét javasoljuk. Nem utolsó sorban úgy véljük, hogy a kutatásunkban használt módszerek további optimalizálása és validálása szükséges ahhoz, hogy az említett hormonok vemhességvizsgálati jelentőségét teljes magabiztossággal meg lehessen ítélni.

8 Összefoglalás

A ma élő 36 vadmacskafajból 23 fenyegetett vagy veszélyeztetett státuszban van természetes elterjedési területén. A populáció csökkenésének fő okai az erdőirtások, a természetes élőhelyek megsemmisülése, illetve széttagolódása, valamint az ember-állat konfliktusok. *In situ* és *ex situ* természetvédelmi erőfeszítések egyaránt szükségesek ezen fajok kihalásának elkerülése érdekében. A szaporodásélettan endokrin változásainak megismerése elengedhetetlen a helyes tartási körülmények megteremtéséhez. Vérminták használata a hormonszint ellenőrzéséhez a stressz okozta nagy kockázat miatt kontraindikált, különösen vemhes állatokban. Nagymacskákban a reprodukív tulajdonságok, mint például az ösztrusz ciklus hossza, fajspecifikusak, így mindegyik faj külön vizsgálatot igényel.

Kutatásunk célja a hollandiai ARTIS Amsterdam Royal Zoo nőstény jaguárjának hormonális vizsgálata volt. Viselkedését naponta megfigyeltük az ivarzási tünetek detektálása érdekében, továbbá bélsár- és vizeletmintákat is gyűjtöttünk. A feltételezett vemhesség különböző fázisaiból származó mintákból progeszteron és 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂ α (PGFM) koncentrációkat mértünk enzyme immunoassay használatával.

A bélsármintákból mért progeszteron értékek a 0,27 $\mu\text{g/g}$ - 9,61 $\mu\text{g/g}$ tartományba estek, míg a vizeletmintákból 57,56 ng/ml koncentráció is mérésre került. Ugyan a vadmacskák bélsarából mérhető progeszteron metabolitok koncentrációja széles skálán mozog, eredményeink a Felidae család fajaiban mért értékek alsó határára estek. Mindamellert értékeink nem tértek el jelentősen a jaguárokkal kapcsolatos, már publikált irodalmi adatoktól, arra utalva, hogy ebben a fajban ez lehet az élettani tartomány.

A bélsármintákból mért PGFM értékek a 18,11 ng/g - 84,28 ng/g tartományba estek. A PGFM, mint lehetséges biomarker használata még egy fejlődésben lévő vemhességvizsgálati módszer, és tudomásunk szerint a miénk a második kutatás, mely ezt a hormont diagnosztikai szempontból vizsgálja. Míg az úttörő tanulmány ígéretes eredményeket ért el egy kis egyedszámú kísérletben, a mi eredményeink nem erősítik meg azon hipotézisüket, miszerint a vemhesség késői fázisában végzett PGFM mérés már néhány mintából biztos vemhességi diagnózist ad.

Habár megszületett két jaguár kölyök, a hormonális alapú vizsgálatunk a vemhesség tényét sem kizárni, sem megerősíteni nem tudta. Az egyértelmű tendenciák hiányához hozzájárul a kis mintaszám, valamint a fajspecifikus endokrin ismeretek hiánya is. További kutatások keretein belül szükséges a vemhességi hormonok longitudinális monitorozása, valamint a jelenlegi módszerek további optimalizálása és validálása.

9 Angol nyelvű cím és rövid összefoglalás

Hormone-based pregnancy monitoring in a jaguar (*Panthera onca*)

Out of the 36 currently extant wild cat species 23 are threatened or endangered with extinction in their natural range. The population declines are due to deforestation, loss and fragmentation of natural habitats, and human-animal conflicts. *In situ* and *ex situ* conservation efforts are both imperative to protect these species from extinction. Understanding the endocrine status associated with reproductive physiology is crucial for proper captive management practices. Using blood samples for hormonal analysis is contraindicated due to the high risk associated with stress, especially in pregnant animals. All big cats have species-specific reproductive characteristics, such as the length of the oestrus cycle and the possibility of spontaneous ovulation, and therefore every species has to be individually investigated.

In our study we examined the endocrinological status of the female jaguar in ARTIS Amsterdam Royal Zoo, the Netherlands. She was observed daily for signs of oestrus behaviour in order to facilitate successful copulations, while faecal and urine samples were also collected for hormonal analysis. These samples from different stages of a suspected pregnancy were examined for progesterone and 13,14-dihydro-15-keto-PGF_{2α} (PGFM) levels using enzyme immunoassays.

The obtained progesterone values ranged from 0,27 µg/g to 9,61 µg/g in faecal samples, while reached up to 57,56 ng/ml in urine samples. While wild cats show a high variability in faecal progesterone metabolite levels, our results are on the low end of concentrations measured in all species of Felidae. However, these values fall close to data already published for jaguars, suggesting this could be the physiological range for this species. The PGFM values were obtained in a range of 18,11 ng/g to 84,28 ng/g from the faecal samples. Using PGFM as a potential biomarker is still a developing method of hormone-based pregnancy monitoring, and ours is, as far as we know, the second study attempting to work with this hormone. While the pioneering study showed promising results with a small sample size, our results failed to support their hypothesis, that in the late term pregnancy can be confirmed by measuring PGFM in only a few samples.

Our results of two jaguar cubs are self-evident, yet our hormonal analysis fails to either confirm or reject pregnancy. The lack of clear trends is attributed to the limited number of samples, as well as to the lack of species-specific endocrinological knowledge. Future research should include longitudinal monitoring of hormonal changes throughout the entire pregnancy, as well as further optimization and validation of the current methodology.

10 Irodalomjegyzék

AZA, J. species survival plan (2016) (*Panthera onca*) CARE MANUAL CREATED BY THE AZA Jaguar Species Survival Plan ®.

Brown, J. L.; Wasser, S. K.; Wildt, D. E.; Graham, L. H. (1994) „Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces.”, *Biology of reproduction*, 51(4), o. 776–786.

Brown, J. L.; Wildt, D. E.; Graham, L. H.; Byers, A. P.; Collins, L.; Barrett, S.; Howard, J. G. (1995) „Natural versus chorionic gonadotropin-induced ovarian responses in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) assessed by fecal steroid analysis.”, *Biology of reproduction*, 53(1), o. 93–102.

Brown, J. L.; Wildt, D. E.; Wielebnowski, N.; Goodrowe, K. L.; Graham, L. H.; Wells, S.; Howard, J. G. (1996) „Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids.”, *Journal of reproduction and fertility*, 106(2), o. 337–346.

Brown, J. L. és Wildt, D. E. (1997) „Assessing reproductive status in wild felids by non-invasive faecal steroid monitoring”, *International Zoo Yearbook*, 35, o. 173–191.

Brown, J. L. (2006) „Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids”, *Theriogenology*, 66(1), o. 25–36.

Brown, J. L. (2011) „Female reproductive cycles of wild female felids”, *Animal Reproduction Science*. Elsevier B.V., 124(3–4), o. 155–162.

Dehnhard, M.; Finkenwirth, C.; Crosier, A.; Penfold, L.; Ringleb, J.; Jewgenow, K. (2012) „Using PGFM (13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F_{2α}) as a non-invasive pregnancy marker for felids”, *Theriogenology*. Elsevier Inc., 77(6), o. 1088–1099.

Dehnhard, M., Naidenko, S. V. és Jewgenow, K. (2014) „Comparative metabolism of PGFM (13,14-dihydro-15-keto-PGF_{2α}) in feces of felids”, *Theriogenology*. Elsevier Inc, 81(5), o. 733–743.

Dehnhard, M.; Kumar, V.; Chandrasekhar, M.; Jewgenow, K.; Umaphathy, G. (2015) „Non-invasive pregnancy diagnosis in big cats using the PGFM (13,14-dihydro-15-keto-PGF_{2α}) assay”, *PLoS ONE*, 10(12), o. 1–12.

Eizirik, E.; Kim, J. H.; Menotti-Raymond, M.; Crawshaw, P. G. Jr.; O'Brien, S. J.; Johnson, W. E. (2001) „Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae).”, *Molecular Ecology*, 10(1), o. 65–79.

Frenyó, V. L. és Rudas, P. (1995) *Az állatorvosi élettan alapjai*. Springer Hungarica K.

- Göritz, F.; Dehnhard, M.; Hildebrandt, T. B.; Naidenko, S. V.; Vargas, A.; Martinez, F.; López-Bao, J. V.; Palomares, F.; Jewgenow, K. (2009) „Non cat-like ovarian cycle in the eurasian and the iberian lynx - Ultrasonographical and endocrinological analysis”, in *Reproduction in Domestic Animals*, o. 87–91..
- Graham, L. H.; Schwarzenberger, F.; Möstl, E.; Galama, W.; Savage, A. (2001) „A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum”, *Zoo Biology*, 20(DECEMBER), o. 227–236.
- Gröschl, M. (2008) „Current status of salivary hormone analysis”, *Clinical Chemistry*, o. 1759–1769.
- International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. (2008) *The IUCN red list of threatened species*. IUCN Global Species Programme Red List Unit.
- Jewgenow, K.; Göritz, F.; Vargas, A.; Dehnhard, M. (2009) „Seasonal profiles of ovarian activity in iberian lynx (*lynx pardinus*) based on urinary hormone metabolite analyses”, in *Reproduction in Domestic Animals*, o. 92–97.
- Kersey, D. C. és Dehnhard, M. (2014) „The use of noninvasive and minimally invasive methods in endocrinology for threatened mammalian species conservation”, *General and Comparative Endocrinology*. Elsevier Inc., 203(May), o. 296–306.
- Khan, M. Z.; Altmann, J.; Isani, S. S.; Yu, J. (2002) „A matter of time: evaluation the storage of fecal samples for steroid analysis”, *General and Comparative Endocrinology*, 128(1), o. 57–64.
- Lasley, B. és Kirkpatrick, J. (1991) „Monitoring ovarian function in captive and free-ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids 121 121”, *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 22(1), o. 23–31.
- Moberg, G. P. (1985) „Influence of Stress on Reproduction: Measure of Well-being”, in *Animal Stress*, o. 245–267.
- Moreira, N.; Monteiro-Filho, E. L. A.; Moraes, W.; Swanson, W. F.; Graham, L. H.; Pasquali, O. L.; Gomes, M. L. F.; Morais, R. N.; Wildt, D. E.; Brown, J. L. (2001) „Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus.”, *Zoo Biology*, 20(2), o. 103–116.
- Möstl, E., Rettenbacher, S. és Palme, R. (2005) „Measurement of corticosterone metabolites in birds’ droppings: An analytical approach”, in *Annals of the New York Academy of Sciences*, o. 17–34.
- Palme, R. (2005) „Measuring fecal steroids: Guidelines for practical application”, in *Annals of the New York Academy of Sciences*, o. 75–80.

- Palme, R.; Touma, C.; Arias, N.; Dominchin, M. F.; Lepschy, M. (2013) „Steroid extraction: Get the best out of faecal samples”, *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 100(9–10), o. 238–246.
- Pocock, R. I. (1939) „The races of jaguar (*Panthera onca*)”, *Novitates Zoologicae*, 41, o. 406–422.
- Rabinowitz, A. R., Nottingham, B. és Nottingham, Jr., B. G. (1986) „Ecology and behaviour of the Jaguar (*Panthera onca*) in Belize, Central America”, *Journal of Zoology*, o. 149–159.
- Sadleir, R. M. F. S. (1966) „Notes on reproduction in the larger Felidae”, *International Zoo Yearbook*, 6, o. 184–187.
- Schwarzenberger, F.; Möstl, E.; Palme, R.; Bamberg, E. (1996) „Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals”, *Animal Reproduction Science*, 42(1–4), o. 515–526.
- Schwarzenberger, F. és Brown, J. L. (2013) „Hormone monitoring: An important tool for the breeding management of wildlife species”, *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 100(9–10), o. 209–225.
- Shille, V. M.; Haggerty, M.A.; Shackleton, C.; Lasley, B.L. (1990) „Metabolites of estradiol in serum, bile, intestine and feces of the domestic cat (*Felis catus*)”, *Theriogenology*, 34(4), o. 779–794.
- Stehlik, J. (1971) „Breeding jaguars at Ostrava Zoo”, *International Zoo Yearbook*, 11, o. 116–118.
- Swanson, W. F. és Brown, J. L. (2004) „International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids”, *Animal Reproduction Science*, 82–83, o. 21–34.
- Umamathy, G.; Sontakke, S. D.; Srinivasu, K.; Kiran, T.; Kholkute, S. D.; Shivaji, S. (2007) „Estrus behavior and fecal steroid profiles in the Asiatic lion (*Panthera leo persica*) during natural and gonadotropin-induced estrus”, *Animal Reproduction Science*, 101(3–4), o. 313–325.
- Umamathy, G.; Kumar, V.; Meha Kabra; W.; Shivaji, S. (2013) „Detection of pregnancy and fertility status in big cats using an enzyme immunoassay based on 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one”, *General and Comparative Endocrinology*. Elsevier Inc., 180(1), o. 33–38.
- Wildt, D. E., Platz, C. C.; Chakraborty, P. K.; Seager, S. W. J. (1979) „Oestrous and ovarian activity in a female jaguar (*Panthera onca*)”, *Journal of Reproduction and Fertility*, 56, o. 555–558.

Wildt, D. E., Brown, J. L. és Swanson, W. F. (1998) „Cats”, in *Encyclopedia of reproduction 1*, o. 497–510.

Young, K. M.; Walker, S. L.; Lanthier, C.; Waddell, W. T.; Monfort, S. L.; Brown, J. L. (2004) „Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses”, *General and Comparative Endocrinology*, 137(2), o. 148–165.

11 Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, dr. Martine van Zijll Langhoutnak, a téma ajánlásáért és munkám támogatásáért és dr. Gál Jánosnak, aki befogadta és észrevételeivel segítette munkámat. Nagy hálával tartozom az amszterdami ARTIS állatkert állatgondozóinak és Szánthó Jánosnak, akik e kísérlet megvalósulását lehetővé tették. Továbbá köszönettel tartozom dr. Jella Wautersnek, a ghenti Állatorvostudományi Egyetem munkatársának az EIA vizsgálatok kapcsán nyújtott pótolhatatlan segítségéért és dr. Marno Woltersnek, hogy biztató észrevételeivel folyamatosan segítette munkámat. Nem utolsó sorban köszönöm családomnak és barátaimnak, akik támogatásukkal segítették dolgozatom elkészítését.

NYILATKOZAT

Alulírott HORVÁTH KATALIN MÁRIA..... nyilatkozom, hogy szakdolgozatom,
melynek címe ..HORMONÁLIS ALAPÚ VERMESSÉGVIZSGÁLAT JAGUÁR BAN..
..(PANTHERA ONCA).....
tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a ..2017.....
évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2018. október 26.

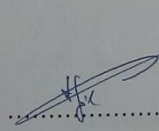
HORVÁTH KATALIN MÁRIA, *K.K.*

a hallgató neve és aláírása

Témavezetői nyilatkozat

AlulírottGál János....., mint témavezető nyilatkozom, hogyHorváth Katalin Mária..... állatorvostanhallgató „...Hormonális alapú vemhességvizsgálat jaguárban (*Panthera onca*).....” c. dolgozata részt vehet az Állatorvostudományi Egyetem 2017. évi Tudományos Diákköri Konferenciáján.

Budapest, 2017. 10. 17.


.....
témavezető

