



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

Kemisk kommunikation hos häst

Lena Axelsson

Uppsala

2011

Examensarbete inom veterinärprogrammet

ISSN 1652-8697
Examensarbete 2011:26

Kemisk kommunikation hos häst

Lena Axelsson

Huvudhandledare: Anne-Marie Dalin, Institutionen för kliniska vetenskaper
Biträdande handledare: Kristina Nordeus, Institutionen för kliniska vetenskaper
Biträdande handledare: Raimondas Mozuraitis, Avdelningen för organisk kemi, KTH
Biträdande handledare: Anna Karin Borg Karlsson, Avdelningen för organisk kemi, KTH

Examinator: Bernt Jones, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2011
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp

Nyckelord: kresol, feromon, häst, östrus

Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2011:26

SAMMANFATTNING

Feromoner är substanser som används vid kemisk kommunikation mellan individer av samma art. Hos häst har ännu inga feromoner identifierats men studier gjorda i Litauen tyder på att kresoler, ämnen som bildas i tarmen vid nedbrytning av bland annat aminosyror och som utsöndras via urin och avföring, kan ha feromon effekt hos häst.

Syftet med detta examensarbete var att undersöka förekomsten av kresoler och andra substanser i urin och brunstsekret från ston i östrus med hänsyn till variation mellan dagar i brunst och mellan provmaterial.

Prover samlades in från 8 ston under 10 brunster och vid tre tillfällen från ston i diöstrus. Uppsamling av flyktiga substanser från urin- och sekretproverna gjordes med "Solid Phase Micro Extraction" (SPME). För separering och identifiering av substanserna användes gaskromatografi och masspektrometri. De relativa mängderna *p*- och *m*-kresol i urin och sekret beräknades utifrån kromatogram för varje dag i brunst och jämfördes mellan dagar i brunst och mellan urin och sekret.

P- och *m*-kresol förekom i både urin och sekret. Generellt innehöll sekret större mängder kresol än urin. I sekret var nivåerna av både *p*- och *m*-kresol lägre dag 3 före ovulation än övriga dagar med en stegring mot ovulationsdagen. Mängderna kresol i urin varierade under hela brunsten och ingen tydlig stegring närmare ovulation kunde ses. Diöstrusurin innehöll något mindre *p*-kresol än östrusurin, och i stort sett ingen *m*-kresol.

Både urin och sekret visade sig innehålla ett stort antal ämnen utöver kresoler. Det gick inte att utifrån en översiktlig genomgång av kromatogrammen avgöra om det förelåg någon skillnad mellan provtyper och mellan dagar i brunst.

Slutsats

Resultaten tyder på att både urin och brunstsekret från ston innehåller information om reproduktionsstadium och att *p* - och *m*-kresol kan vara de ämnen som förmedlar denna information, var för sig eller tillsammans med andra ämnen som finns i urin och sekret.

ABSTRACT

Pheromones are substances that are used in chemical communication between individuals of the same species. So far, no pheromones have been identified in the horse. Studies done in Lithuania suggested that cresols, substances that are produced in the intestines during for example amino acids degradation and excreted in urine and faeces, could have pheromonal effect in horses.

The purpose of this study was to investigate the presence of cresols and other substances in urine and oestrous secretions from mares in oestrus and to investigate whether there were any variations between days of oestrus and between type of sample.

Samples were collected from 8 mares during 10 oestruses and in three cases from dioestrous mares. Collection of volatile substances from urine and oestrous secretions were done with "Solid Phase Micro Extraction" (SPME). Gas chromatography and masspectronomy were used for separation and identification of the substances. The relative amounts of *p*- and *m*-cresol in urine and secretions were calculated from chromatograms for each day of oestrus and were then compared between days of oestrus and between urine and secretions.

P- and *m*-cresol were present in both urine and secretions. Generally, oestrous secretions contained a higher amount of cresol than did urine. The levels of both *p*- and *m*-cresol in secretions were lower on day 3 before ovulation than other days of oestrus with an increase towards the day of ovulation. The amounts of cresols present in urine varied during the whole oestrous period and no obvious increase towards ovulation could be seen. Dioestrous urine contained slightly less *p*-cresol than did oestrous urine, and almost no *m*-cresol.

Both urine and secretions contained a large number of substances apart from cresols. Without calculating the peaks of these other substances in the chromatograms it was not possible to determine whether there were any differences between sample types and days of oestrus.

Conclusion

The results suggest that both urine and oestrous secretions contain information about reproductive status and that *p*- and *m*-cresol may be the substances that convey this information, by themselves or together with other substances found in urine and oestrous secretions.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	1
Slutsats	1
ABSTRACT.....	2
Conclusion	2
INLEDNING	5
Feromoner	5
Brunst hos sto.....	9
Syfte med examensarbete	11
MATERIAL OCH METODER	11
Insamling av prover	11
Analys av prover	11
Tolkning.....	12
RESULTAT	13
Allmänt	13
Kresolnivåer i förhållande till dag i brunst	15
Mängden kresol i sekret jämfört med i urin.....	16
DISKUSSION.....	18
Slutsats	19
LITTERATURFÖRTECKNING.....	20

INLEDNING

Urin och vaginalsekret som källa till kemisk kommunikation mellan djur är känt hos bland annat mus, nöt och häst. Hos honmöss påskyndades puberteten om de kom i kontakt med MUPs och flyktiga ämnen bundna till dessa, som hade renats fram ur urin från könsmogna hanmöss (Mucignat-Caretta *et al.*, 1995) och hanmöss kunde känna skillnad mellan östrusurin och icke-östrusurin från honmöss (Achiraman *et al.*, 2010). Tjurar uppvisade oftare flehmen när de exponerades för vaginalsekret jämfört med exponering för saliv, avföring och mjölk från kor i östrus (Sankar & Archunan, 2004). Hos häst finns beteendestudier gjorda där man sett att hästar med hjälp av enbart urin kan skilja på kön och reproduktionsstatus men inte på olika individer (Hothersall *et al.* 2010).

Hos däggdjur har endast ett fåtal feromon identifierats. Ett exempel är den asiatiska elefanten, hos vilken (Z)-7-dodecen-1-yl acetate (Z7-12iAc) har isolerats från honelefanters urin och i bioassays fungerat som ett sexferomon (Rasmussen *et al.*, 1997). I avföring från nöt har tre östrusspecifika ämnen identifierats och testats på tjurar (Sankar & Archunan, 2008). En blandning av alla tre ämnen gav starkare respons i form av flehmen än ämnena var för sig. Detta visar att bioaktiva ämnen kan ha synergistisk effekt.

Kresoler är flyktiga molekyler som hos däggdjur bildas vid mikrobiell nedbrytning i tarmen av foder rikt på lignin, aminosyror och aromatiska steroider. De utsöndras från kroppen via urin och avföring. Kresoler finns i tre isomera former, para-, meta- och ortokresol.

I detta examensarbete studeras kemiska substanser i urin och sekret från brunstiga ston, specifikt *p*-kresoler. Bakgrunden till examensprojektet är tidigare, men ännu opublicerade, försök gjorda i Litauen 2005 (personlig kommunikation, Mozuraitis, 2010) som visade att koncentrationen *p*-kresol i urin från brunstiga ston ökade med dag i brunsten och hade en topp vid ovulation. *P*-kresoler i olika sammansättningar testades därför på hingstar och dessa visade ökat intresse.

Feromoner

Allmänt

Karlson och Lüscher (1959) skapade termen feromon. De definierade det som ett kemiskt ämne som utsöndras från en individ och uppfattas av en annan individ av samma art hos vilken ett specifikt svar framkallas. Feromoner påverkar bland annat reproduktion, modersomsorg, aggressivitet och beteende vid fara. Ett ämne som har feromon effekt hos ett djurslag kan i vissa fall uppfattas av en annan djurart men kallas då inte för feromon utan allelokemikalie.

Den kemiska strukturen hos feromoner beror på vilken funktion feromonet har. Feromon som ska spridas snabbt en längre sträcka är flyktiga och ofta små molekyler medan feromon som behöver stanna en längre tid i miljön är mer stabila och består av större molekyler (Wyatt, 2003). En del flyktiga feromon använder bärarmolekyler för att kunna transporteras i kroppsvätskor som till exempel urin och för att stanna kvar längre i miljön. Ett exempel på bärarmolekyl är ”major urinary proteins” (MUPs) som finns i musurin (Sharro *et al.*, 2002). Feromoner är produkter som bland annat bildas vid nedbrytning i tarmen av till

exempel aminosyror och fettsyror, och som utsöndras via urin och avföring. Andra feromon produceras i körtlar strategiskt placerade på kroppen, till exempel vid ögat, i flanken eller runt könsorganen (Wyatt, 2003).

Kemiska signaler från omgivningen detekteras hos de flesta djur med hjälp av smak- och luktsinna.

Smaksinnet är enklare uppbyggt och använder andra delar av hjärnan än luktsinnet. Till exempel har smaksinnet en enklare signalöverföring till hjärnan, utan processande av informationen på vägen, vilket sker med luktsignaler. Antalet ämnen som kan uppfattas och skiljas åt med hjälp av smaksinnet är också färre än hos luktsinnet (Wyatt, 2003).

Luktsinnet är välutvecklat hos många djur och ryggradsdjur har ofta två olfaktoriska system. Det första, det huvudsakliga olfaktoriska systemet ("main olfactory system", MOS), använder sensoriska celler i epitel belägna i bakre delen av näshålan. Därifrån skickas signalen till hjärnan via huvudsakliga olfaktoriska bulben. Det andra systemet, det accessoriska systemet ("accessory olfactory system", AOS), skickar sina signaler via accessoriska olfaktoriska bulben till andra delar av hjärnan. AOS består bland annat av det vomeronasala organet (vomeronasal organ, VNO) som är två tubulära strukturer belägna i botten av den främre delen av näshålan på var sin sida om septumväggen. Tuberna har enbart en främre öppning till näshålan; bakåt slutar de blint (Wyatt, 2003).

Länge har det ansetts att de båda systemen har strikt skilda funktioner. AOS med VNO skulle vara specialiserad på att detektera feromon och MOS skulle känna av dofter. Försök på kanin och svin har visat att vissa kända feromon kan ha effekt trots att VNO satts ur spel (Hudson & Distel, 1986; Dorries *et al*, 1997), liksom att VNO kan känna av andra ämnen än feromon (Trinh & Storm, 2003). I vissa fall kan MOS vidarebefordra liknande signaler som VNO gör, men i andra fall påverkar även andra stimuli som beröring och synintryck beteendet (Anderson *et al*, 1996).

Feromoner hos häst

Hästar använder luktsinnet i flera sammanhang, bland annat när de söker föda, när ett sto skapar band till sitt föl (Wolski *et al*, 1980), för att känna igen individer och för att visa dominans (Rubenstein & Hack, 1992).

I samband med undersökning av urin, avföring, förlossningsvätskor och andra doftande ämnen med hjälp av lukt uppvisar flera djurslag, till exempel häst och nöt (Sankar *et al*, 2004), ett beteende som kallas flehmen. Djuret lyfter då på överläppen, höjer huvudet och sträcker på nacken. Troligen är det ett sätt för djuret att föra kemiska substanser till det vomeronasala organet. Flehmen förknippas oftast med könsmogna hingstar som luktar på brunstiga ston, men även ston och olika åldersgrupper, både hingst och sto, uppvisar detta beteende. Fältstudier gjorda på ston med föl har visat att hingstföl uppvisar flehmen oftare än stoföl och ston, och att stoföl uppvisar det oftare än ston (Crowell-Davis & Houpt, 1985). I en annan studie gjord av Marinier *et al* (1988) undersöktes förekomsten av flehmen hos hingstar som fick lukta på urin/sekret från brunstiga respektive icke-brunstiga ston. Ingen signifikant skillnad i reaktion från hingstarna mellan de olika brunstcykelstadierna noterades.

Analysmetoder

Vid identifiering av kemiska ämnen som har feromoneffekt är det generella upplägget av undersökningar ofta detsamma medan detaljerna skiljer sig åt beroende på ämnets egenskaper (exempel från Rasmussen *et al*, 1997); i följd observera, isolera, separera, identifiera, syntetisera, samt testa substans med hjälp av en "bioassay". En bioassay är ett experiment där ett ämnes effekt på en levande organism mäts.

Först observeras ett beteende som anses påverkas av ett prov, det vill säga dess kemiska signaler. Till exempel kan den tid som ett djur tillbringar med att lukta på ett prov mätas eller så kan djurets preferenser för olika material observeras.

Efter observationsstudien försöker man isolera ämnen från det prov som testats och som gett ändrat beteende. Beroende på provets och ämnenas egenskaper varierar metoderna för isolering. Ämnen i fasta prover och mindre flyktiga ämnen i vattenprover kan extraheras med organiska lösningsmedel. Flyktiga ämnen i vattenprover och luftprover kan isoleras med "Solid Phase Microextractor" (SPME) där ämnen absorberas på en fiber som är täckt med olika ytskikt beroende på vilken typ av ämne som ska isoleras. De ämnen som isolerats testas sedan med ytterligare en bioassay för att undersöka om de aktuella substanserna har någon påverkan på djur.

Det isolerade ämnet kan separeras ytterligare i fraktioner för att finna de aktiva, kemiska komponenterna. Separering görs vanligen med kromatografi. I alla kromatografimetoder används en stationär fas, ofta kiselbaserad, och en rörlig fas i form av en gas eller vätska. Föreningar med olika löslighet i den rörliga fasen och olika affinitet för den stationära fasen rör sig olika snabbt genom kromatografen, denna tid kallas retentionstid. Gaskromatografi ("gas chromatography", GC) använder gas som rörlig fas och separerar mest med avseende på molekylstorlek (bild 1). Vid vätskekromatografi ("liquid chromatography", LC) är vätska den mobila fasen, och här separeras ämnen med olika polaritet. Resultaten kan visas i ett kromatogram med retentionstid på x-axeln och relativ förekomst av ämnen på y-axeln (se bild 5 och 6). Den största toppen, bastoppen, tillskrivs intensitet 100 % och övriga toppar får proportionella värden i procent av bastoppen (Solomons & Fryhle, 2000).

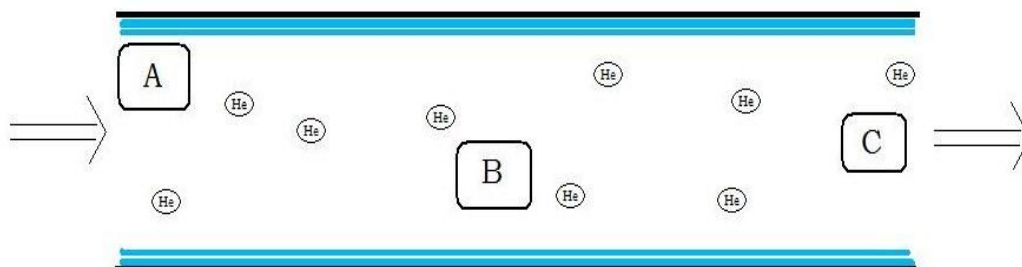


Bild 1. Principskiss för gaskromatografi. Rörrets insida är täckt med den stationära fasen och helium utgör den mobila fasen. A, B och C representerar molekyler med olika affinitet och löslighet och som därför rör sig olika snabbt genom röret.

För att identifiera vilken fraktion som har den utlösande effekten på beteende kan en bioassay användas, antingen genom att börja med en fraktion och lägga till fler eller börja med ett fullständigt prov och sedan ta bort en fraktion i taget. Ofta har bioaktiva ämnen synergistisk effekt, vilket innebär att de var för sig inte ger lika stor effekt som de gör tillsammans.

När de fraktioner som har feromoneffekt har identifierats ska den kemiska sammansättningen bestämmas. Detta kan göras med exempelvis masspektrometri (MS) (bild 2). Metoden har hög känslighet och ger information om ämnens kemiska struktur. I en masspektrometer skjuts molekyler sönder av elektroner till joniserade fragment vilka är typiska för de enskilda molekylerna. De joniserade fragmenten accelereras av ett elektriskt fält vidare in i ett magnetfält. Beroende på magnetfältets styrka ändrar fragmenten sina banor olika mycket. Endast vissa banor leder in i detektorn där fragmenten registreras av en jonuppsamlare (i vårt fall en elektronmultiplikator). Intensiteten motsvarar den relativa förekomsten av de joniserade fragmenten. Med kunskap om den accelererande spänningen och magnetfältets styrka kan massan för fragmenten beräknas. Alltsammans presenteras i ett masspektrogram där x-axeln visar massa och y-axeln intensitet (bild 3). Kommersiella bibliotek med olika ämnens kända masspektrogram kan användas för identifiering (Solomons & Fryhle, 2000).

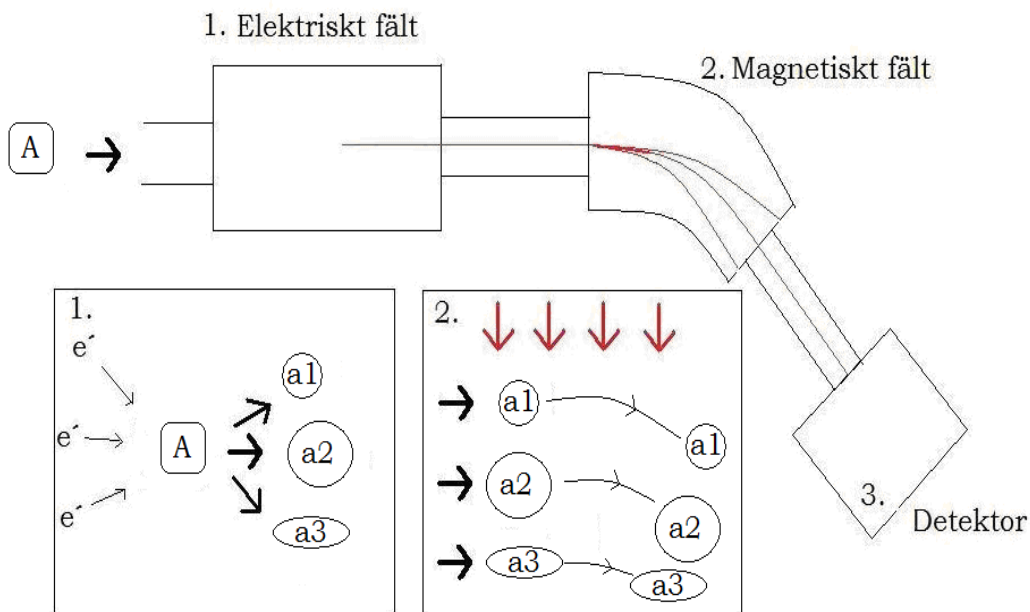


Bild 2. Principskiss för masspektrometri. Molekylen A delas upp i joniserade fragment (a_1 , a_2 , a_3) vilka i magnetfältet ändrar sina banor beroende på magnetfältets styrka.

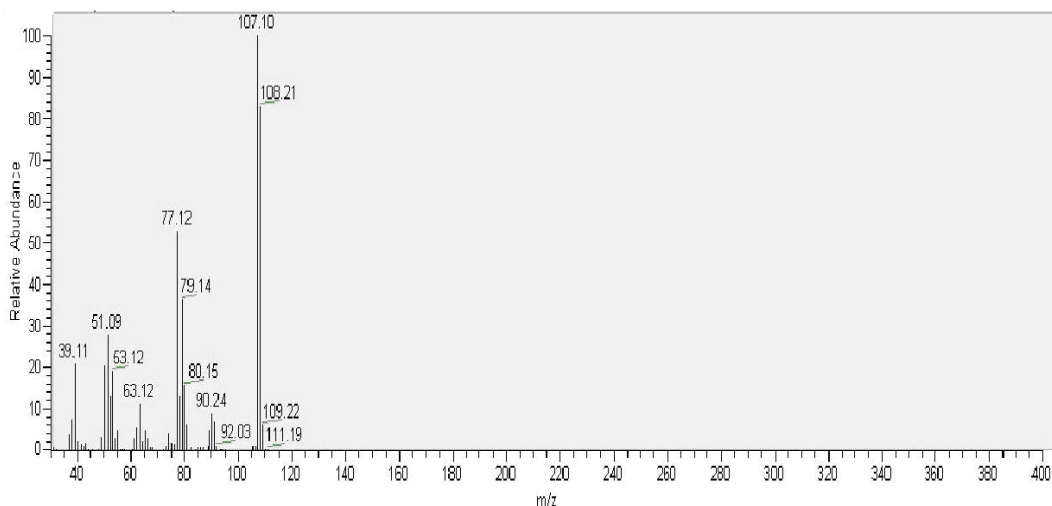


Bild 3. P-kresols masspektrogram. X-axeln visar massan och y-axeln visar den relativa förekomsten av de olika joniserade fragmenten.

När den kemiska sammansättningen identifierats syntetiseras ämnet för att slutligen testas i bioassays. Cirkeln är sluten.

Brunst hos sto

Allmänt om brunst

Hästar är säsongsmässigt polyöstrala. Deras reproduktiva period börjar i mars och pågår till oktober/november, med individuella variationer. Under denna tid har de upprepade brunstcykler om de inte är dräktiga. Det är framför allt den ökande dagsljuslängden som startar äggstocksaktiviteten på senvintern (Allen, 1977). Den första brunsten på våren är längre än de som kommer därefter och ovulation sker inte normalt. Denna period, liksom tiden i slutet av säsongen, kallas för övergångsperiod. Under vintern har de flesta ston en anovulatorisk period utan cyklisk äggstocksaktivitet.

Brunstcykel

En normal brunstcykel hos sto är 21-22 dagar lång med en variation på 18-24 dagar. Den kan uppdelas i proöstrus, östrus, metöstrus och diöstrus. Under proöstrus, förbrunsten, visar stoet ett ökat intresse för hingsten men tillåter inte parning. Efter 1-2 dagar inträder östrus, brunsten, då stoet uppvisar typiska brunstecken som att i närheten av en hingst ställa sig med sänkt bäcken, lyfta på svansen, blinka med klitoris och avge måttliga mängder urinliknande vätska från vulva. Stoet tillåter nu parning. Brunsten varar 4-8 dagar under högsäsong. Ovulation sker vanligen 24-48 timmar före brunstens slut. Om stoet inte blir dräktigt under brunsten följer en period av diöstrus, normalt 2 veckor lång. Stoet är då vid närmanden från en hingst irriterat, sparkar, biter, lägger öronen bakåt och skriker. En del ston uppvisar varken positiva eller negativa tecken inför hingst och kallas då neutrala.

Beteende mellan sto och hingst

Hästar är sociala djur som i det vilda lever i flockar med flera ston och en ledarhingst, eventuellt med unga, ej könsmogna hingstar. Den hingst som får

betäcka har kontinuerlig kontakt med stona i sin flock, även under den anöstrala vinterperioden. Interagerandet kan utgöras av försiktiga närmanden, putsande och doftundersökning av urin och avföring. Frekvensen kontaktsökande ökar under brunst (McDonnell, 2000).

Hingsten kan skilja på ston med olika social status. Äldre ston i den egna flocken vaktas noga, uppvaktas och betäcks under brunst. Unga, köns mogna ston uppvaktas inte men vaktas noga. Under brunst tillåts de unga, köns mogna stona att röra sig fritt och även röra sig till andra flockar. Äldre ston från andra flockar som närmar sig jagas bort av både hingsten och de andra stona i flocken. Unga ston från andra flockar kan tillåtas en kortare tid i utkanten av flocken utan att uppvaktas eller vaktas av hingsten, eller så jagas de iväg direkt av hingsten (McDonnell, 2000).

Bland fritt levande hästar är det till stor del stoet som styr med vilken hingst och när uppvaktning och parning ska ske. Pickerel *et al* (1993) observerade att ston kan ha preferenser för individuella hingstar. De populäraste hingstarna lät mer än de andra. Vid studier av fritt levande hästar såg McDonnell (2000) att 88% av de interaktioner som ledde till betäckning var initierade av stoet. I början av brunsten närmar sig stoet hingsten men är aggressiv när denne kommer för nära. Senare i brunsten tillåter hon närmanden huvud mot huvud för att sedan vända sin bakdel mot hingsten. Detta beteende gör hingsten mer sexuellt intresserad av stoet. Hingsten å sin sida visar sitt intresse genom att nasa, gnida med mulen, slicka och nafs på stoets huvud, bog, flank, ljumskar och bakdel. I närheten av urin eller vaginalsekret andas hingsten in luft i stora drag och uppvisar flehmen. Efter tillräcklig teasing tillåter stoet parning. Ståreflexen stimulerar hingsten till att hoppa upp. Det är normalt med flera upphopp utan ejakulation. Detta verkar vara ett sätt för hingsten att testa och/eller att utlösa en tydlig ståreflex hos stoet. Stoet intar en ställning som underlättar för hingsten att föra in penis. Efter ejakulationen brukar hingsten vila en kort stund innan den går ner. Under denna tid står stoet stilla. När hingsten är redo går stoet sakta framåt så att hingsten glider av över stoets bakdel och mjukt kan landa med båda frambenen (McDonnell, 2000).

Bedöma brunst

För att undersöka om ett sto är i brunst, östrus, behövs en hingst för "teasing". Ston kan visa östrusbeteende även utan en hingst i närheten men det är i praktiken inte tillförlitligt. Vid teasing presenteras ett sto för en hingst och då noteras stoets beteende, det vill säga om stoet står stilla (ståreflex), lyfter svansen, blinkar med klitoris och skvätter. Teasing sker antingen individuellt eller i grupp. I Sverige är det vanligast med individuell teasing, då ett sto åt gången förs fram till en hingst. Sto och hingst ska då vara åtskilda med en boxdörr eller liknande för att skydda hästarna och stohållaren från skador. Först får stoet hälsa på hingsten huvud mot huvud. Sedan förs stoet fram så att hennes bakdel blir åtkomlig för hingsten som kan lukta och nafs. Även ett brunstigt sto kan till en början vara irriterat för att efter ett tag uppvisa östrusbeteende.

Vid gruppteasing rör sig ston fritt i en hage/paddock och hingsten förs fram till staketet eller placeras i en intilliggande paddock. Ston i brunst närmar sig hingsten i större utsträckning än icke-brunstiga ston, och kan uppvisa brunstbeteenden. Nackdelen med denna metod är att inte alla brunstiga ston närmar sig hingsten

självmant. Sociala faktorer kan inverka, till exempel att dominanta ston håller undan brunstiga, subdominanta ston.

Syfte med examensarbete

Syftet med detta examensprojekt var att undersöka förekomsten av kemiska substanser i urin och vaginalsekret från ston i brunst, och specifikt undersöka förekomsten av kresol. Hypotesen var att koncentrationen av kresol i både urin och sekret ökar med dag i brunsten samt att sekret innehåller en större mängd kresol och andra kemiska substanser än urin.

MATERIAL OCH METODER

Insamling av prover

Tio ston tillhörande institutionen för kliniska vetenskaper, avdelningen för reproduktion, SLU, provtogs under våren 2010. Samtliga var svenska varmblodiga travare. Åldern varierade mellan 9 – 19 år (medelålder 15,2 år). Urin och brunstsekret samlades en gång per dag vid ungefär samma tidpunkt under de dagar då stona uppvisade brunsttecken vid teasing med hingst. Brunstkontroll utfördes dagligen av stallpersonal eller av veterinärstudenter. Urin samlades dessutom från tre ston under diöstrus. Urin samlades när stona spontant urinerade och brunstsekret samlades i samband med teasing. Proverna samlades först upp i väl rengjorda glas, därefter hälldes vätskorna över i glasrör med skruvlock (Sample Vials 30ml, Brown Chromatography Supplies) som sedan var infrysta i -18 grader fram till analys.

Provvolymer varierade mellan 5 och 30 ml för urin och mellan 1 och 30 ml för sekret. Två ston gav alltför små mängder sekret och vid för få dagar för att proverna skulle kunna analyseras. Dessa ston utgick ur försöket. Åtta ston gav tillräckliga volymer av urin och sekret för analys. Totalt analyserades 96 stycken prover, varav 40 urin, 53 sekret och 3 diöstrusurin (tagna 2-6 dagar efter ovulation).

Varje dag under brunst togs dessutom blodprov för senare analys av östrogen- och progesteronnivåer. Proverna togs från jugularvenen med vacutainer och heparinrör (Venoject, Lithium Heparin, 10 ml). Rören centrifugerades i 10 min, 3000 varv/minut, och plasma avskildes och frystes in. Av samtliga prover valdes 19 stycken ut för progesteronanalys och 35 stycken för östrogenanalys. I varje brunst valdes ett blodprov taget i början och ett taget i slutet för progesteronanalys. Analys av östrogen gjordes för de tre sista dagarna av brunsten. Hormonanalyserna utfördes vid Universitetsdjursjukhuset, Ultuna, avdelningen för klinisk kemi, enligt de rutinmetoder som används där.

Brunstlängden varierade mellan 4 och 12 dagar. När stoet inte visade brunsttecken längre gjordes en gynekologisk undersökning med rektalisering och ultraljud för att påvisa att ovulation skett och att en gulkropp bildats.

Analys av prover

Uppsamling av substanser

Analysmetoden som användes vid detta försök baserades på Pawliszyn (1997) och har anpassats av Mozuaritis *et al* (2010) för kresoler i urin och sekret från häst.

Urin och brunstsekret analyserades på samma sätt. Proverna tinades i vattenbad precis innan beredning. För att öka frisättningen av flyktiga ämnen från urinen/sekretet blandades 1 ml av den tinade urinen/sekretet med NaCl-salt (utan tillsatser) i ett glasrör med skruvlock. Mängden salt var inte exakt utan tillräcklig för att allt salt inte skulle lösas upp. Från denna saltblandning fördes ½ ml över till ett mindre glasrör med skruvlock och membran i locket. Till detta tillsattes 50 ng standardlösning som vid första analystillfället var 4-metoxy-fenol i metanol (10 mikrogram/ml) och vid andra analystillfället pentadekan i cyklohexan (50 mikrogram/ml). För att samla upp flyktiga ämnen från vätskorna användes ”Solid Phase Micro Extraction” (SPME). Med denna metod absorberas flyktiga ämnen från ett luftrum (headspace) ovanför en vätskeyta av en SPME-fiber (bild 4). I detta försök användes en SPME-fiber av typ PDMS/DVB (Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene). För att det skulle bli jämvikt mellan koncentrationen flyktiga ämnen i headspace och i vätskan lades glasröret på sidan för ekvibrering i 40 grader under 20 minuter. Därefter gjordes ett litet hål i behållarens membran ovanför vätskenivån och SPME-fibern fördes in. Under 55-60 minuter absorberade fibern flyktiga ämnen från headspace i 40 grader.

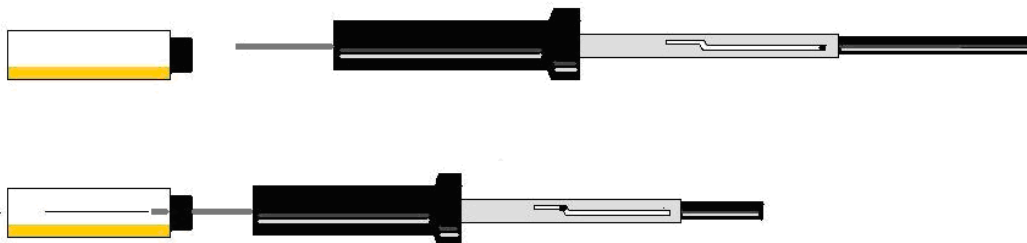


Bild 4. En SPME-fiber i hållare. Hållarens spets förs in genom membranet i behållarens lock, varpå fibern skruvas ut i headspace.

Gaskromatografi/ Masspektrometri

Systemet som användes var en Varian 3400 gas chromatograph med HP-FFAP kapillärkolonn och DB-Waxkolonn (Agilent J&W) vid första respektive andra analystillfället samt Finnigan SSQ 7000. Kolonnerna var polära med likvärdiga separationer av kresolerna. Temperaturprogrammet var 40 grader i 1 minut, ökning med 4 grader/minut till 200 grader som sedan hölls konstant i 0.01 minuter, därefter en ny ökning med 10 grader/minut till 230 grader som hölls konstant i 11 minuter. Injektortemperaturen var 230 grader och translinjens temperatur var 235 grader. Splitless-perioden, det vill säga den tid som luftströmmen med provet fördes in över kolonnen, varade i 1 minut.

Tolkning

Arean under *p*- och *m*-kresolernas samt standardlösningarnas kurvtoppar i ett totaljonskromatogram (TIC) beräknades med programmet X-Calibur (Thermo-Finnigan) för varje prov. Ämnens identitet bestämdes med masspektrogram och biblioteket NIST. För statistisk beräkning av skillnader i mängd kresol i de olika proverna användes *Wilcoxon matched pairs test*. Denna metod användes eftersom värdena inte kunde antas vara normalfördelade.

RESULTAT

Allmänt

Volymen, färgen och utseendet på provvätskorna varierade mellan ston lika mycket som mellan dagar. Volymen urin vid provtagning var generellt större än volymen sekret men vissa ston gav även stora mängder sekret vid teasing. Färgen på både urin och sekret varierade mellan ljus citrongul till mörkt honungsfärgad. Sekret upplevdes ibland som tätare än urin från samma dag, men den mindre mängden sekret kunde ge ett falskt tätare utseende. Inget mönster mellan provvätskornas utseende och dag i brunst kunde utrönas.

För vissa brunstdagar fanns det alltför få prov för att kunna använda statistiska test. Två ston hade längre brunst, det vill säga fler samlingsdagar än de övriga hästarna vilket gav endast två prover på dag 11, 10, 9, 8 och 7 före ovulation. Dessa dagar har uteslutits ur den statistiska beräkningen. På ovulationsdagen var det endast fem ston som gav prover; av dessa gav tre ston både urin och sekret och övriga två enbart urin.

I detta projekt var vi framför allt intresserade av *p*- och *m*-kresol. En översiktlig genomgång av kromatogram från början, mitten och slutet av de 10 brunsterna visade på ett stort antal ämnen utöver kresoler i både sekret och urin. Ingen tydlig skillnad i antalet ämnen och mängden av dessa vid olika tidpunkter kunde observeras utan beräkningar. Kurvorna i bild 5 och 6 visar den relativa förekomsten av olika ämnen i sekret respektive urin från ett sto en dag (dag 8 i brunst). Det mest förekommande ämnets topp tillskrevs intensiteten 100 % och de övriga ämnena jämfördes med den. Mängden standardlösning var densamma i alla prover från samma period.

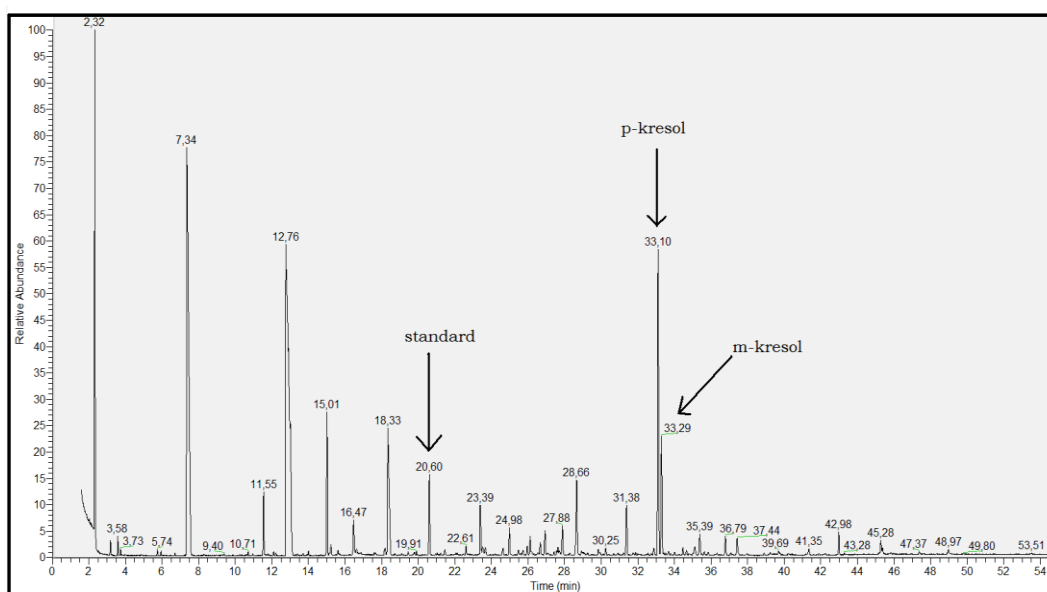


Bild 5. Kromatogram som visar sekretprov från sto A fyra dagar före ovulation. Toppen med retentionstid 33.10 var *p*-kresol och med 33.29 *m*-kresol. Toppen vid 20.60 var standarden.

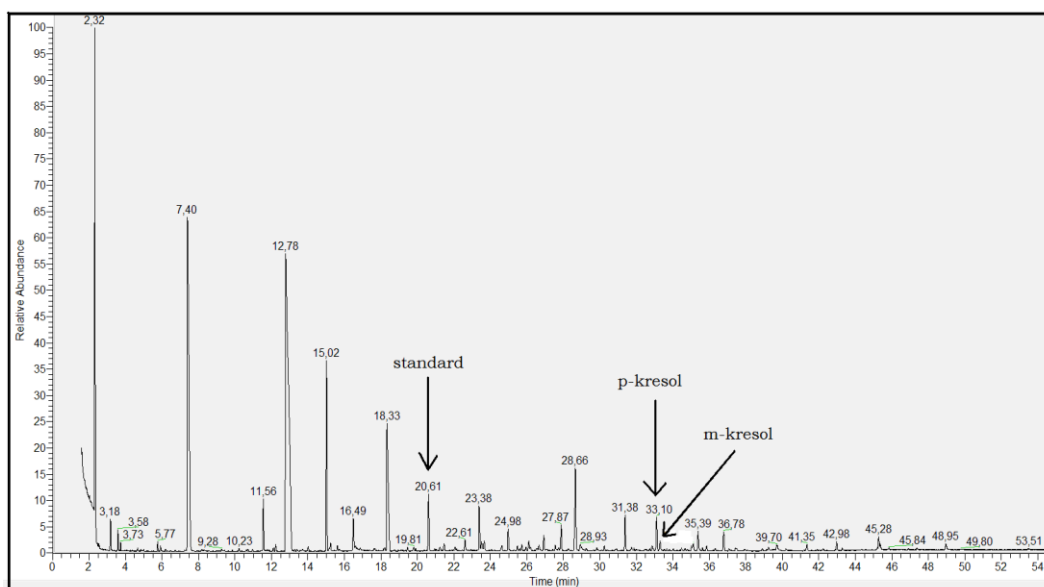


Bild 6. Kromatogram som visar urinprov från sto A fyra dagar före ovulation. Toppen med retentionstid 33.10 var p-kresol och med 33.29 m-kresol. Toppen vid 20.61 var standarden.

Analyser av blodproverna visade att progesteronnivåerna var låga under brunst och högre vid diöstrus (tabell 1) samt att östradiolnivåerna var höga under brunst och sjönk vid ovulation (tabell 2).

Tabell 1. Progesteronnivåer i blod

Dag före ovulation	Progesteron medel (nmol/l)	Progesteron sd (nmol/l)
0	0,6	0
-1	1,05	0,71
-2	x	x
-3	0,6	0
-4	0,6	0
-5	0,6	0
-6	0,6	0
-7	0,8	0
-8	0,6	0
-9	x	x
-10	x	x
-11	0,6	0
Diöstrus	31,8	0

Tabell 2. Östradiolnivåer i blod

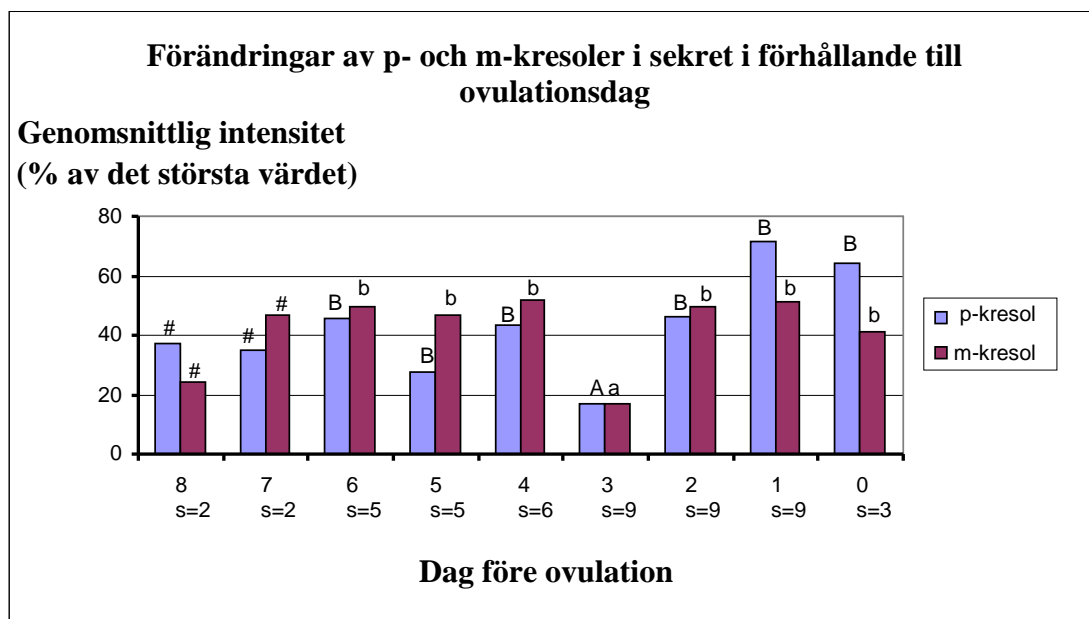
Dag före ovulation	Östradiol medel (pmol/l)	Östradiol sd (pmol/l)
0	17,5	11,3
-1	26,8	14,2
-2	29,3	11,5
-3	30,3	12,8

Kresolnivåer i förhållande till dag i brunst

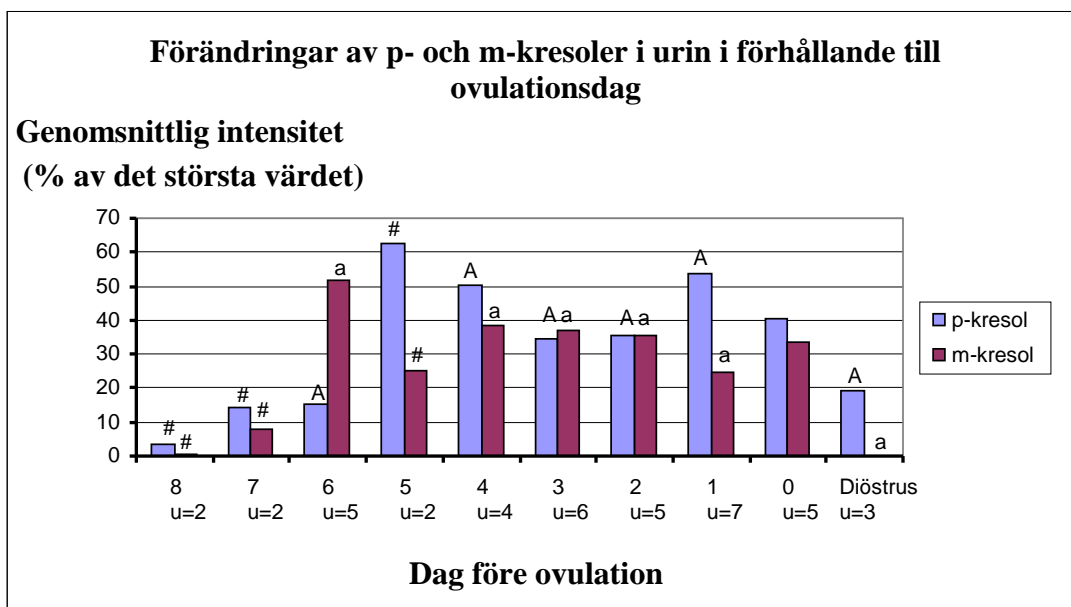
I sekret var kresolmängderna (*p*- och *m*-kresol) signifikant lägre dag 3 än övriga dagar, beräknat på alla ston (Figur 1). Mellan de andra dagarna sågs ingen signifikant skillnad. *M*-kresolnivån låg, med undantag för dag 3, relativt stilla medan *p*-kresol varierade mer. En tendens mot ökande mängder *p*-kresol närmare ovulation kunde ses i sekret.

I urin förelåg ingen signifikant skillnad i kresolnivåer mellan någon av dagarna (Figur 2). Båda kresoltyperna pendlade upp och ner i mängd under brunstcykeln och ingen tydlig trend kunde ses.

I diöstrusurin var nivåerna av *p*-kresol lägre än i urin från dagarna närmast ovulation, och *m*-kresolnivåerna var mycket låga, dock utan signifikans.



Figur 1. Kresoler i sekret. Mellan staplar med samma färg och olika bokstäver vid olika dagar föreligger en signifikant skillnad ($P < 0.05$). Versaler (A, B) betecknar skillnad för *p*-kresol (blå). Gemener (a, b) betecknar skillnad för *m*-kresol (vinröd). # innebär att antalet prov var för få för statistisk beräkning. *s* = antalet sekretprov.

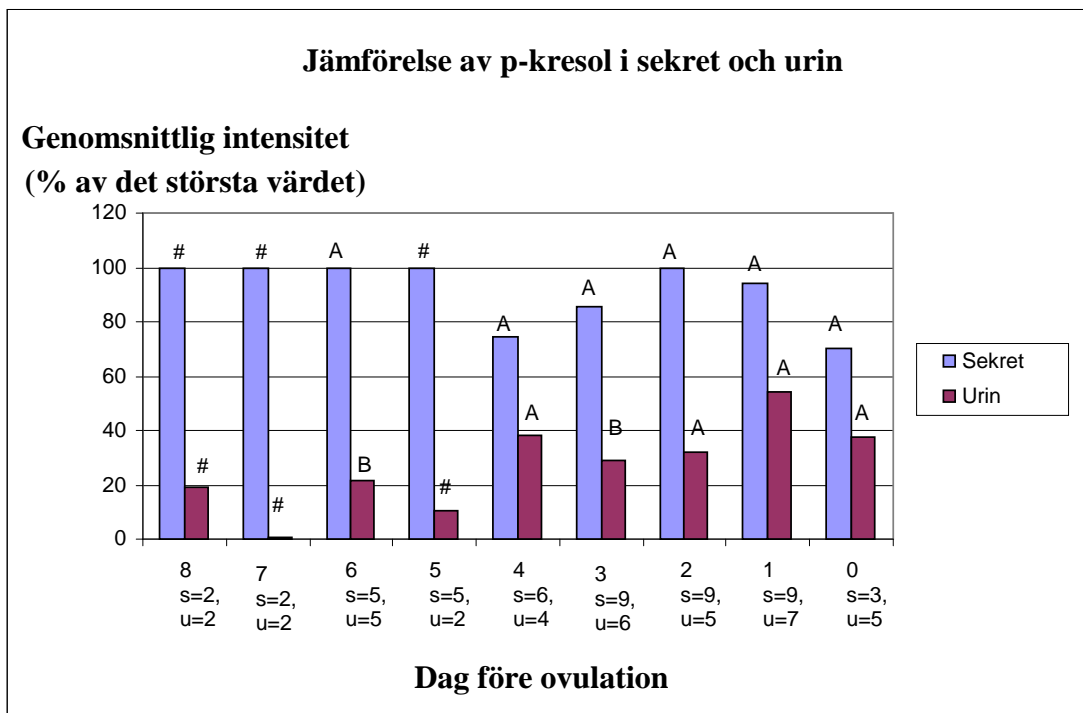


Figur 2. Kresoler i urin. Mellan staplar med samma färg och olika bokstäver vid olika dagar föreligger en signifikant skillnad ($P < 0.05$). Versaler (A, B) betecknar skillnad för p-kresol (blå), Gemener (a,b) betecknar skillnad för m-kresol (vinröd). # innebär att antalet prov var för få för statistisk beräkning. u = antalet urinprov.

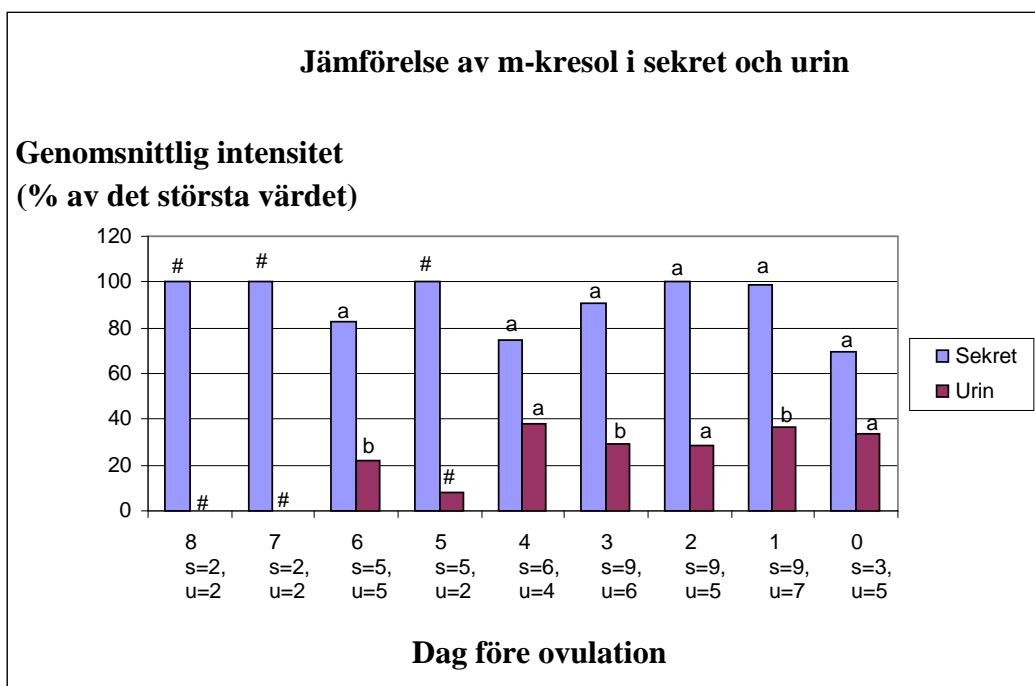
Mängden kresol i sekret jämfört med i urin

P-kresolnivåerna i sekret var för två av dagarna (d6 och d3 före ovulation) signifikant högre än p-kresolnivåerna i urin (Figur 3). Övriga dagar innehöll sekret mer p-kresol än urin men utan signifikans.

Nivåerna av m-kresol var under tre dagar (d6, d3 och d1 före ovulation) signifikant högre i sekret än i urin, och under övriga dagar högre men utan signifikans (Figur 4).



Figur 3. P-kresol i sekret och urin. Mellan staplar med olika bokstäver samma dag föreligger signifikant skillnad ($P < 0.05$). # innebär att antalet prov var för få för statistisk beräkning. s = antalet sekretprov, u = antalet urinprov.



Figur 4. M-kresol i sekret och urin. Mellan staplar med olika bokstäver samma dag föreligger signifikant skillnad ($P < 0.05$). * innebär att antalet prov var för få för statistisk beräkning. s = antalet sekretprov, u = antalet urinprov.

DISKUSSION

Under försöket har ett stort antal prover, både sekret och urin, samlats in. Vissa dagar var dock antalet insamlade prover färre än vad som krävdes för statistiskt relevant jämförelse. Detta berodde på flera saker. Vid samling av urin togs spontankastad urin, framför allt i samband med att stona togs in från paddockar på eftermiddagarna. Det var inte alltid som stona urinerade då vi som tog proverna var i stallet eller så att vi hann in i boxarna i tid med provtagningsutrustning. Två ston hade flera dagar längre brunst än övriga ston vilket ledde till några dagar med endast enstaka prover. Kring ovulation hade vissa ston hunnit passera brunst och blev irriterade på hingsten och gav därför inte något brunstsekret vid teasing.

En alternativ samlingsmetod till spontankastad urin är samling med urinkateter. Med denna metod kan insamlingstillfällena bestämmas av personalen och mängden prov kan lättare kontrolleras. Metoden är dock invasiv och kräver mycket god hygien vid provtagning samt kunnig personal. Ett annat alternativ, vilket kräver mer förarbete, är att genom betingning lära hästen att urinera vid ett givet kommando eller stimuli. Ingen av metoderna var aktuell för detta försök.

Hos häst finns ännu inget ämne med feromoneffekt identifierat. Ma och Klemm (1997) fann i stourin flera ämnen som varierade under brunsten och ett ämne som var unikt för östrus jämfört med diöstrusurin. Inga försök att identifiera eller testa ämnena på hingstar gjordes. Vid kemisk analys av urin och avföring från vilda hästar i Kanada återfanns fler flyktiga ämnen i avföring än i urin (Kimura, 2001). Antalet och mängden substanser i avföring var större under parningssäsong än under andra delar av året. *P*- och *m*-kresol hittades i urin och avföring från ston, hingstar och föl. *P*-kresolnivåerna i urin var under parningssäsong högre hos hingstar än hos ston, och diöstrusurin innehöll högre nivåer av *p*-kresol än urin från östrus. *M*-kresol förekom i något större mängder i diöstrusurin än i östrusurin från de vilda hästarna och inte alls i urin eller avföring från tiden utanför parningssäsongen. Detta skiljer sig från resultaten i detta examensarbete där *p*-kresolnivåerna i östrusurin generellt var högre än i diöstrusurin, och *m*-kresolnivåerna var nära noll under diöstrus. I vårt försök samlades urin direkt vid spontanurinering från hästar som hölls under kontrollerade förhållanden, medan det i det kanadensiska försöket samlades sand där de vilda hästarna urinerat. Kanske denna insamlingsmetod kan ha påverkat mängden flyktiga ämnen i urinen från de olika stadierna. Den geografiska skillnaden med olika klimat- och foderförhållanden skulle möjligen även kunna påverka produktionen av kresoler.

Vår hypotes inför försöket var att mängden kresol ökar under brunsten i både urin och sekret. Om kresol fungerar som ett sexferomon för häst är det rimligt att anta att det har en topp vid ovulation för att signalera till hingsten att det är optimal tid för parning. Resultaten tyder på att framför allt *p*-kresol men även *m*-kresol stiger i sekret inför ovulation. I urin varierade nivåerna av båda kresolerna så pass mycket att det var svårt att se någon stegring i slutet av brunsten. Resultatet i denna studie skiljer sig från försöket i Litauen, där en tydlig stegring av *p*-kresol i urin sågs under brunst med en topp vid ovulation. Om det var geografiska skillnader, insamlingsmetoder eller analysteknik som gav olika resultat kan inte bedömas. Det visar dock hur viktigt det är att forskning pågår på flera håll samtidigt för att testa olika hypoteser och metoder.

Mängden kresol i sekret var generellt högre än i urin, med signifikanta skillnader under två dagar för *p*-kresol och tre dagar för *m*-kresol. Det stämmer med den andra delen av vår hypotes, att sekret innehåller större mängder kresol än östrusurin. Ston ger ifrån sig sekret enbart under brunst och vid teasing. Vi tror därför att sekretet kan innehålla mer information om stoets reproduktionsstatus än urin och även fungera bättre som sexuell stimulans för hingsten än urin.

Det fanns många övriga ämnen i både urin och sekret. Utan närmare genomgång av kromatogram med mängdberäkning av substanser går det inte att avgöra om det är någon skillnad mellan de olika provtyperna och under brunst. Det är mycket troligt att flera av dessa substanser kan ha feromoneffekt, var för sig eller flera i samverkan, och det skulle vara intressant att undersöka dessa för att se om det föreligger skillnader under brunst och i jämförelse med diöstrus. En naturlig fortsättning skulle vara att testa substanserna på hingstar, det vill säga i en bioassay, vilket har gjorts för *p*-kresol i en annan students examensarbete.

Slutsats

Resultaten tyder på att både urin och brunstsekret från ston innehåller information om brunststadium och att *p* - och *m*-kresol kan vara de ämnen som förmedlar denna information, var för sig eller tillsammans med andra ämnen som finns i urin och sekret.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Achiraman, S., Ponmanickam, P., Sankar Ganesh, D., Archunan, G. (2010) *Detection of estrus by male mice: Synergistic role of olfactory-vomer nasal system*. Neuroscience Letters. Doi:10.1016/j.neulet.2010.04.051.
- Allen, W.R. (1977) *Artificial control of the mare's oestrus cycle*. Vet. Rec. 100, 68-71.
- Anderson, T.M., Pickett, B.W., Heird, J.C., Squires, E.L. (1996) *Effect of blocking vision and olfaction on sexual responses of haltered or loose stallions*. Journal of Equine Veterinary Science, vol 16, 254-261.
- Crowell-Davis, S.L. (2007) *Sexual behavior of mares*. Hormones and behavior 52, 12-17.
- Crowell-Davis, S., Houpt, K.A. (1985) *The ontogeny of flehmen in horses*. Anim. Behav. 33, 739-745.
- Dorries, K.M., Adkins, R.E., Halpern, B.P. (1997) *Sensitivity and behavioral responses to the pheromone androstetnone are not mediated by the vomeronasal organ in domestic pigs*. Brain Behav. Evol. 49, 56-62.
- Hothersall, B., Harris, P., Sörtoft, L., Nicol, C.J. (2010) *Discrimination between conspecific odour samples in the horse (Equus caballus)*. Applied animal behaviour science 126, 37-44.
- Hudson, R., Distel, H. (1986) *Pheromonal release of suckling in rabbits does not depend on the vomeronasal organ*. Physiol. Behav. 37, 123-129.
- Karlson, P., Lüscher, M. (1959) *"Pheromones": a new term for a class of biologically active substances*. Nature 183, 55-56.
- Kimura, R. (2001) *Volatile substances in feces, urine and urine-marked feces of feral horses*. Canadian Journal of Animal Science, Vol 81, 411-420.
- Ma, W., Klemm, W.R. (1997) *Variations of equine urinary volatile compounds during the oestrus cycle*. Veterinary research communications 21, 437-446.
- Marinier, S.L., Alexander, A.J., Waring, G.H. (1988) *Flehmen behavior in the domestic horse: Discrimination of conspecific odours*. Appl. Anim. Behav. Sci. 19, 227-237.
- McDonnell, S.M. (2000) *Reproductive behavior of stallions and mares: comparison of free-running and domestic in-hand breeding*. Animal reproduction science 60-61, 211-219.
- Mozuraitis, R., Buda, V., Borg-Karlson, A-K. (2010) *Optimization of solid-phase microextraction sampling for analysis of volatile compounds emitted from oestrus urine of mares*. Z. Naturforsch. 65, 127-133.
- Mucignat-Caretta, C., Caretta, A., Cavaggioni, A. (1995) *Acceleration of puberty onset in female mice by male urinary proteins*. Journal of physiology 486, 517-522.
- Pawliszyn, J. (1997) *Solid phase microextraction: theory and practice*. Wiley-VCH, Inc. New York. 11-41.
- Pickerel, T.M., Crowell-Davis, S.L., Caudle, A.B., Estep, D.Q. (1993) *Sexual preference of mares (Equus caballus) for individual stallions*. Applied Animal Behaviour Science 38, 1-13.
- Rasmussen, L.E.L., Lee, T.D., Zhang, A., Roelofs, W.L., Daves Jr, G.D. (1997) *Purification, identification, concentration and bioactivity of (Z)-7-Dodecen-1-yl acetate: Sex pheromone of the female asian elephant, Elephas maximus*. Chem. Senses 22, 417-437.
- Rubenstein, D.I., Hack, M.A. (1992) *Horse signals: the sounds and scents of fury*. Evolutionary Ecology 6, 254-260.

- Sankar, R., Archunan, G. (2004) *Flehmen response in bull: role of vaginal mucus and other body fluids of bovine with special reference to estrus*. Behavioural processes 67, 81-86.
- Sankar, R., Archunan, G (2008) *Identification of putative pheromones in bovine (Bos Taurus) faeces in relation to estrus detection*. Animal reproduction science 103, 149-153.
- Sharrow, S.D., Vaughn, J.L., Zidek, L., Novotny, M.V. (2002) *Pheromone binding by polymorphic mouse major urinary proteins*. Protein Science 11, 2247-2256.
- Solomons, T.W.G., Fryhle, C.B. (2000) *Organic chemistry*. Uppl 7. John Wiley & Sons, New York. 403-421.
- Stevens, K., Perry, G.C., Long, S.E. (1982) *Effect of ewe urine and vaginal secretions on ram investigative behavior*. Journal of chemical ecology, vol 8, 23-29.
- Trinh, K., Storm, D.R. (2003) *Vomer nasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium*. Nat. Neurosci. 6, 519-525.
- Waring, G.H. (2003) *Horse behavior*. Uppl 2. Noyes Publications/Willams Andrew Publishing, Norwich. 190.
- Wolski, T.R., Houpt, K.A., Aronson, R. (1980) *The role of the senses in mare—foal recognition*. Applied Animal Ethology, vol 6, 121-138.
- Wyatt, T.D. (2003) *Pheromones and animal behaviour. Communication by smell and taste*. Cambridge university press, New York. 8-16, 164-185.