

Spuug, plas, poep - alternatieve matrices om hormonen in te bepalen

Vivian C. Goerlich-Jansson

Departement Population Health Sciences, Afdeling Dier in Wetenschap en Maatschappij, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht, contact: v.c.goerlich-jansson@uu.nl

Inleiding

In het onderzoek met proefdieren zijn we voortdurend bezig met de 3 V's – Vervanging, Verfijning, Vermindering. In dit artikel ga ik vooral in op Verfijning, dus het vermijden en verminderen van pijn, lijden, angst of blijvende schade ervaren door het dier. Door het gebruik van de nieuwste in-vivo technologieën is op dit vlak vaak al een grote stap te maken. Ik zal een aantal technieken en monstertypes (matrices) bespreken die als alternatieven gebruikt kunnen worden om hormonen te meten. Sommige van deze technieken zullen waarschijnlijk ook geschikt zijn om andere stoffen te bepalen.

In veel natuurwetenschappelijke disciplines zijn we geïnteresseerd in hormoonspiegels. Steroïdhormonen zijn belangrijke stoffen die talrijke processen in het lichaam regelen. Bekende voorbeelden zijn gedrag, voortplanting, stressfysiologie maar ook cardiovasculaire ziektes en kanker [1]. Steroïdhormonen die bij de mens voorkomen, worden bij bijna alle diersoorten ook gevonden, zelfs bij weekdieren [2]. Vooral in onderzoek naar dierenwelzijn zijn metingen van glucocorticoïden als indicatoren van stress die door het dier ervaren wordt, zeer populair [3]. De zogenaamde geslachtshormonen (zoals testosteron, estradiol, progesteron) worden voornamelijk in de gonaden aangemaakt, glucocorticoïden (cortisol en corticosteron) worden vooral in de bijnieren geproduceerd. Maar ook het brein of zelfs de huid kunnen steroïden aanmaken. De hormonen belanden in de bloedbaan en worden naar hun bestemming (organen en/of brein) getransporteerd. Op locatie komen de hormonen de cel binnen en binden aan receptoren die de moleculen in de celkern brengen. Dit complex bindt aan het DNA en beïnvloedt de activiteit van genen, zodat vervolgens meer of minder van een bepaalde proteïne aangemaakt wordt. Het verloop van dit proces via het genoom kan meerdere uren duren. Minder bekend zijn de directe, niet-genomische effecten van hormonen, die binnen enkele seconden kunnen optreden [4].

Er valt nog veel te onderzoeken op het vlak van hormonen en hun invloed op gedrag en fysiologie van mens en dier. Vele processen worden dan ook niet door maar een enkel hormoon geregeld, maar door het samenspel van stijgende en dalende spiegels van meerdere hormoon types. Hormonen kunnen de productie van elkaar remmen en reguleren hun eigen productie vaak via negatieve feedback. Voor veel vraagstellingen zou het dan dus ook voordelig zijn om meerdere hormonen binnen een monster te kunnen bepalen.

Afhankelijk van de hoogte van de spiegels en de gevoeligheid van de bepalingmethoden moet dan ook een relatief grote hoeveelheid monster verzameld worden.

Techneken voor hormoonmetingen

Hormonen worden voornamelijk met behulp van immunosassays gemeten. Hierbij bindt een antilichaam, gemerkt met radioactiviteit (radioimmunoassay, RIA) of enzymen (enzyme linked immunoassay, ELISA) aan het hormoon in het monster. Het signaal van het monster wordt gemeten en de concentratie afgelezen aan de hand van een standaardreeks met bekende concentraties. Inmiddels zijn er veel commerciële assay-kits in de handel beschikbaar. Deze kits verschillen voornamelijk in het antilichaam wat ingezet wordt. De specificiteit, dus de gevoeligheid van een antilichaam voor een bepaald hormoon of metaboliet zijn van belang voor de keuze van het juiste kit. De meesten kits zijn gericht op hormoonbepalingen in monsters van mensen of knaagdieren. Voordat men hiermee monsters van andere diersoorten meet, moeten de kits dus zorgvuldig gevalideerd worden [5, 6]. Dan nog kan er door de lage specificiteit van sommige antilichamen een valspositief resultaat ontstaan. Zo wordt bijvoorbeeld in veel onderzoeken het steroïde corticosteron in vogeleieren met commerciële kits gemeten. Nader onderzoek met high-performance liquid chromatography (HPLC) laat echter zien dat de antilichamen blijkbaar aan andere hormonen in het ei binden. De hoeveelheden corticosteron zijn vele malen lager dan door de immunoassays bepaalde waarden [7, 8]. Verder zijn liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) en gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) methoden om hormonen en moleculen nauwkeurig te meten [9].

Matrices voor hormoonbepaling

Tot nu toe worden concentraties van steroïden meestal in het bloed (plasma of serum) bepaald. Als het niet om een terminale monsternamen gaat (het dier wordt gedood om bloed te verzamelen), moet er goed over nagedacht worden hoeveel bloed genomen mag worden en op welke locatie van het dier het monster verzameld wordt (zie Box 1).

Box 1 Keuze van de techniek is afhankelijk van: [10]

- Het doel van de bloedafname, bijvoorbeeld biochemische analyse, DNA-extractie, etc.
- De behoefte aan een arterieel versus veneus monster.
- De duur en frequentie van de bemonstering (> bereken het maximum volume!), gaat het om een terminaal monster?
- De gezondheidsstatus van het dier (bijvoorbeeld ziek, zeer jong/oud, broedseizoen?).
- De impact op het welzijn van het dier.
- De kans op stress-geïnduceerde effecten op biochemische en hematologische parameters.
- De training en de ervaring van de betrokken medewerkers.

Vaak wordt er een vuistregel gebruikt dat men voor een eenmalig bloedmonster 10 % van het totale bloedvolume mag verzamelen [10]. Deze regel wordt ook vertaald naar 1 % van het lichaamsgewicht (0,2 ml bij een muis van 20 g). Het totale bloedvolume is bij de meesten diersoorten echter minder dan 100 ml/kg lichaamsgewicht, en eerder 0,5 - 0,7 ml/kg. Beter is het dus om met 0,5-0,7 % van het lichaamsgewicht te rekenen. Met bijkomend bloedverlies (bijvoorbeeld door een hematoom) wordt in deze formule nog geen rekening gehouden. Het volgende bloedmonster mag dan na drie tot vier weken genomen worden. Het is aan te raden om minder bloed te verzamelen als het dier zeer jong of oud is of in een zwakke toestand verkeert, door ziekte of andere (experimentele) omstandigheden. Worden er meer monsters binnen korte tijd verzameld, dan mag er maximaal 1 % van het bloedvolume per 24 uur genomen worden.

Inmiddels heeft er ook veel ontwikkeling plaatsgevonden op het gebied van microsampling. Er wordt aan gewerkt om metingen van hormonen en andere stoffen (bijvoorbeeld medicijnen) in zeer kleine hoeveelheden (<100µl) bloed te meten [11]. Terwijl resultaten en toepassingsmogelijkheden veelbelovend zijn, moeten er nog verdere stappen ter validatie en verfijning van de methodiek gezet worden [12].

Voor het herhaald afnemen van een bloedmonster kan ook een katheter geplaatst worden. Deze methode <<

betekent een operatieve ingreep en vereist bepaalde voorzorgsmaatregelen. Zo is sociale huisvesting bij sommige dieren dan niet mogelijk omdat ze bij elkaar aan de katheter kunnen knagen. Bloedmonsters kunnen eveneens onder anesthesie afgenomen worden, maar ook dit heeft een risico voor het overleven van het dier en is een ingrijpende handeling waarvan het dier enige tijd herstel nodig heeft. Verder kunnen anesthetica een stressrespons veroorzaken [13].

Het nemen van een bloedmonster is in de regel verbonden met meerdere stressfactoren en veroorzaakt enige pijn: het dier moet worden gevangen, vastgehouden, het bloedvat met een naald aangeprikt. Daarna voelt het dier het bloedverlies en zal enige tijd nodig hebben om te herstellen. Deze handelingen veroorzaken een stressrespons bij het dier, welke in zichzelf al invloed heeft op de lichaamsfysiologie. Glucocorticoïdspiegels stijgen al binnen een minuut vanaf de eerste verstoring van het dier (dus vaak al bij binnenkomst in de kamer, of openen van het verblijf). Door deze omstandigheden is het erg lastig om echte basaalwaarden van dit hormoon (en andere stoffen) te bepalen. In het algemeen wordt aangeraden om bloedmonsters binnen drie minuten te verzamelen, maar ook binnen dit tijdsraam is al een stijging van de spiegels te zien [14].

Om de stress door bloedprikken en het ongerief wat ermee gepaard gaat te vermijden, wordt er al een tijd naar alternatieven gezocht. In de laatste jaren is er veel gedaan en gepubliceerd om alternatieve matrices te valideren. Recent werd er ook in Biotechniek de methode van cortisolmetingen in de wol van schapen beschreven [15]. In de komende alinea zal ik verschillende types monster voorstellen die gebruikt kunnen worden om steroïdhormonen te bepalen.

Alternatieven voor bloedmonsters

Hormonen belanden uit de bloedbaan in allerlei uitwerpselen en uitgroeisels van het lichaam. In sommige matrices zijn de moleculen nog in hun oorspronkelijke vorm, in anderen is de moleculaire structuur iets veranderd (en is het hormoon inactief), of er komen alleen de metabolieten (afbraakproducten) voor, bijvoorbeeld in urine en feces [16]. Dit feit heeft gevolgen voor de biologische interpretatie van de gemeten waarden, omdat bijvoorbeeld hormonen die aan transport-moleculen gekoppeld zijn als inactief gelden [17]. Ook beïnvloedt de matrix het kiezen van de juiste bepalingmethoden, omdat antilichamen in de immunoassay's nogal verschillen in hun gevoeligheid voor de verschillende metabolieten. Sommige assay's kunnen het verschil tussen vrije en gebonden hormonen wel maken, andere niet. Verder moet per diersoort, en soms zelfs per individu, gevalideerd worden welk metaboliet het meest voorkomt en in hoeverre de gemeten waarden de concentraties van het hormoon in het bloed weerspiegelen (zie ook alinea 'Technieken voor hormoonbepaling') [18, 19].

In Tabel 1 wordt een aantal methoden en mogelijke matrices weergegeven die voor de bepaling van steroïdhormonen gebruikt kunnen worden. Er worden bijna maandelijks nieuwe studies gepubliceerd die zich bezighouden met de validatie van deze matrices in verschillende diersoorten. Het nut van de minder of niet-invasieve monsternamen wordt vooral gezien in werk met bedreigde of wilde diersoorten [20], maar de technieken worden ook bij landbouwhuisdieren en gezelschapsdieren vaak toegepast. Veel van de technieken zijn ook voor proefdieren geschikt, afhankelijk van de vraagstelling. Waar een bloedmonster informatie geeft over de acute hormoonspiegel, geven bepalingen in veren of vacht informatie over hormonen die over langere tijd zijn opgeslagen.



Afbeelding 1. Huid en veren.

Tabel 1. Overzicht van technieken en monstertypes (matrix) die gebruikt kunnen worden om steroidhormonen te bepalen. De kolommen geven de aard van informatie weer die het monster geeft (informatie over de acute hormoonspiegel of het gemiddelde over een langere tijdsduur (integraal)), hoe invasief de methodiek is (wordt er iets ingebracht in het dier, wordt er iets uitgetrokken/afgeknipt, waarbij een + meer invasief is), en of de methode geschikt is voor herhaalde metingen (zit er een maximum volume aan?). Een +/- tussen haakjes geeft aan dat deze methode minder invasief is dan het inbrengen van een naald, maar desondanks een ingreep in de integriteit van het dier is (bijvoorbeeld nagels knippen).

Matrix/methode	Informatie hormoonspiegel	Invasief	Herhaalde metingen
Bloedafname via punctie van arterie/vene (oor, staart, vleugel, poot, nek, oog) ^a	Acuut (min)	+	(-)
Bloedafname via katheter ^b	Acuut (min)	+	+
Bloedafname via 'natuurlijke' prik door insecten [21] ^c	Acuut (min-uren)	(+)	+
Speeksel [22] ^d	Acuut (min)	-	+
Melk [23]	Integraal (uren)	-	+
Afgegeven urine [19, 24] ^e	Integraal (uren)	-	+
Afgegeven mest [19, 25] ^f	Integraal (uren-dagen)	-	+
Eieren (dooier en eiwit) [26] ^g	Integraal (dagen)	(-)	(+)
Vacht (geschoren) [27] ^g	Integraal (dagen-maanden)	-	(+)
Veren (geplukt of geknipt) [28] ^h	Integraal (dagen-maanden)	(-)	(+)
Nagels (geknipt) [29] ⁱ	Integraal (dagen-maanden)	(-)	(+)
Water uit aquarium [30] ^k	Integraal (min-dagen)	-	+
Walvissen: blubber, balein, oorsmeer, slijm uit spuitgat [31]	Integraal (min-jaren)	-/+	(+)

^aHet bloedmonster moet snel verzameld worden i.v.m. invloed van stressreactie op hormoonwaarden, eist bekwaamheid, alleen beperkt volume.

^bEen katheter plaatsen is een chirurgische ingreep en eist bekwaamheid. Er bestaat risico op infectie. Deze methode eist soms solitaire huisvesting.

^cBloed moet uit de insecten geëxtraheerd worden (welzijn insecten?), evt. verandering in monsteraanstelling door verteringsenzymen. Parasieten kunnen invloed hebben op de (hormoon)fysiologie van een dier. Zo is bij koolmezen aangetoond dat de eieren van vrouwtjes met vlooiën in het nest lagere hormoonwaarden bevatten [32].

^dHanteren en verzamelen kan een stressreactie veroorzaken, verzamelen van voldoende hoeveelheid speeksel is nogal lastig.

^eHet dieet van het dier kan invloed hebben op hormoonconcentraties. Het volume urine dat per keer afgegeven wordt verschilt nogal. Om de gemeten concentratie te standaardiseren wordt daarom vaak ook het creatininegehalte in de urine gemeten en een hormoon/creatinine-ratio berekend.

Hormonen komen uit het bloed in de lever en nier terecht en worden daar gemetaboliseerd (afgebroken). Ontlasting bevat daarom voornamelijk metabolieten van hormonen en niet het originele hormoon zelf. Het soort dieet maar ook hoeveel er opgenomen wordt, en de tijd van de darmassage zijn belangrijke factoren die enige variatie in gemeten waarden kunnen veroorzaken. Het monster wordt idealiter vers verzameld en ingevroren i.v.m. afbraak van hormonen door bacteriën.

^gHanteren en verzamelen kan een stressreactie veroorzaken. De minimum hoeveelheid haren nodig om een hormoonbepaling te kunnen doen, moet vooraf getest en berekend worden (beperking bij kleine en/of jonge dieren). Hormoonwaarden variëren met locatie van bemonstering en kleur van de vacht (sommige studies vonden dat donker haar minder cortisol bevat dan licht haar).

>>



Afbeelding 2. Een mestmonster in een Eppendorf-cupje.



Afbeelding 3. Speeksel verzamelen bij een hond.

^hHanteren en knippen/plukken kan een stressreactie veroorzaken. Veren trekken veroorzaakt pijn. Slagpennen van vleugels en staart zijn vaak zelfs met het skelet verbonden. Het knippen van veren kan een goed alternatief zijn, of het verzamelen van verloren veren tijdens de rui.

ⁱHanteren en knippen kan een stressreactie veroorzaken. Risico op bloeding als te veel van de nagel geknipt wordt.

^jDe hormonen in een vers gelegd ei stammen af van het moederdier. Als deze gemeten zullen worden, moeten de eieren zo vers mogelijk verzameld worden om de originele waarden te kunnen bepalen. Vanaf het begin van de ontwikkeling van het embryo in het ei begint deze namelijk de hormonen biochemisch te veranderen. Vanaf een bepaalde leeftijd gaat ook het embryo zelf hormonen produceren.

Door het verzamelen van eieren wordt het leven van het embryo beëindigd en daarmee ook de kans op een nakomeling. Afhankelijk van de vraagstelling hoeft men niet het hele legsel te verzamelen, een of twee eieren zijn vaak voldoende. Wel moet dan op de volgorde van leg gelet worden. Bij veel vogelsoorten is er een variatie in ei-hormonen over de legvolgorde aangetoond.

^kTankvolume, stroomsnelheid van het water, visgrootte, biomassa en temperatuur hebben invloed op de gemeten waarden.

Conclusie en aanbevelingen

Voorafgaand aan een proef waarbij bepalingen van steroïdhormonen gedaan moeten worden heb je de wettelijke en morele plicht een methode en matrix te kiezen die het minst belastend is voor het dier (verfijning). Dit artikel geeft een beknopt overzicht over de mogelijkheden van type monsters en methoden voor de bepaling van steroïdhormonen, die een minder invasieve en geschikte vervanger voor het afnemen van bloedmonsters kunnen zijn.

Leidend in de beslissing welk type monster geschikt is, is de onderzoeksvraag die beantwoord moet worden. Inmiddels bestaat er een aantal technieken die niet of tenminste minder invasief zijn dan het afnemen van een bloedmonster. Integrale methoden, zoals mest- en vacht-monsters zijn meer geschikt om 'grote' patronen over langere tijd te volgen, voor acute metingen zijn speeksel- of urinemonsters ook zeer informatief.

Alle beschreven technieken hebben gemeen dat ze vragen om nauwkeurige planning en validatie. Net als bij andere metingen is er een aantal factoren dat invloed kan hebben, zoals de diersoort en -ras of -stam, het geslacht, de leeftijd, in welke fase van het leven het dier bemonsterd wordt (bijvoorbeeld tijdens de

voortplanting of verzorging van jongen), de omgeving (temperatuur, fotoperiode, voedsel) en de tijd van de dag (vooral bij acute metingen). Standaardisatie, ook een belangrijk aspect van verfijning, is daarom een must. Als er voor het eerst met een nieuwe type monster gewerkt wordt, is een vooronderzoek (pilotstudie) zeker van toegevoegde waarde.

Als het toch van belang is om een bloedmonster af te nemen, zijn ook hier mogelijkheden ter verfijning gegeven. Wees voorbereid en check de benodigheden (naalden, buizen, bloedstollende middelen, ...) kort voor begin van de bloedafname. Als er met meerdere mensen gewerkt wordt, maak dan duidelijke afspraken in het team en doe eventueel een testrun. Leg vooraf vast hoe vaak er geprobeerd wordt om een monster te verkrijgen als het na de eerste keer prikken niet lukt. En gebruik elke keer een nieuwe naald; deze wordt snel bot, wat de procedure voor het dier pijnvoller maakt.

Veel van de voorgestelde technieken lijken niet-invasief, maar eisen toch ook het hanteren en fixatie van het dier. Hier kan verfijnd worden door voorafgaande training en het dier aan deze handeling te laten wennen. Soms is ook monstername post mortem mogelijk, zoals veren.

Hormonen, voornamelijk glucocorticoïden, worden vaak ook gebruikt om beter inzicht te krijgen in de welzijnsstatus van een dier. Echter, de hormoonspiegels zeggen, vooral bij eenmalige metingen, weinig over de lading (positief of negatief) van een ervaring of toestand [33]. Het is daarom aan te bevelen om naast fysiologische metingen ook altijd gedragsparameters te monitoren, idealiter over een langere tijdsduur. Gedrag is nog steeds dé uitleesparameter voor de (emotionele) toestand van een dier.

Er valt ook te overwegen of er ook andere, niet-invasieve technieken geschikt zijn om welzijn en stress bij dieren te onderzoeken. Infraroodcamera's worden steeds populairder om te meten of een dier stress ervaart. De lichaamstemperatuur verandert tijdens blootstelling aan stressvolle situaties, wat op de thermobeelden goed te meten is [34].

Bronnen

1. Lösel R, Wehling M (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4: 46–56.
2. Chong Sánchez F, Enriquez Díaz M, Murillo Rodríguez E, et al. (2019). First use of a non-invasive technique for determination of sex hormones in the queen conch *Lobatus gigas*, Mollusca Gastropoda. *Aquaculture International* 27: 437–448.
3. Mormède P, Andanson S, Aupérin B, et al. (2007). Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology & Behavior* 92: 317–339.
4. Hammes SR, Levin ER (2007). Extracellular steroid receptors: Nature and actions. *Endocrine Reviews* 28: 726–741.
5. Abelson KSP, Kallioikoski O, Teilmann AC, et al. (2016). Applicability of commercially available ELISA kits for the quantification of faecal immunoreactive corticosterone metabolites in mice. *In Vivo* 30: 739–744.
6. Kinn Rød AM, Harketstad N, Jellestad FK, et al. (2017). Comparison of commercial ELISA assays for quantification of corticosterone in serum. *Scientific Reports* 7: 6748.
7. Caulfield MP, Padula MP (2020). HPLC MS-MS Analysis Shows Measurement of Corticosterone in Egg Albumen Is Not a Valid Indicator of Chicken Welfare. *Animals* 10: 821.
8. Rettenbacher S, Möstl E, Groothuis TGG (2009). Gestagens and glucocorticoids in chicken eggs. *General and Comparative Endocrinology* 164: 125–129.
9. Murtagh R, Behringer V, Deschner T (2013). LC-MS as a method for non-invasive measurement of steroid hormones and their metabolites in urine and faeces of animals. *WTM - Wiener Tierärztliche Monatschrift* 100: 247–254.
10. National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research (2019). Blood sampling NC3Rs. <https://www.nc3rs.org.uk/3rs-resources/blood-sampling>. Accessed 4 Nov 2020.

Meer referenties over dit onderwerp kunnen bij de auteur worden opgevraagd.