



Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.
Серія: Ветеринарні науки

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies.
Series: Veterinary sciences

ISSN 2518–7554 print
ISSN 2518–1327 online

doi: 10.32718/nvlvet11917
<https://nvlvet.com.ua/index.php/journal>

UDC 636.8:636.082:612.62:615.074

Assessment of 17 β -estradiol stability in domestic cat feces during repeat ELISA analysis of a single sample at a 24-hour interval

O. V. Burlakova¹, V. Yu. Stefanyk^{1✉}, S. Ya. Fedorenko²

¹Stepan Gzhytskyi national university of veterinary medicine and biotechnologies, Lviv, Ukraine

²State biotechnological university, Kharkiv, Ukraine

Article info

Received 19.06.2025
Received in revised form
21.07.2025
Accepted 22.07.2025

Stepan Gzhytskyi National
University of Veterinary Medicine
and Biotechnologies Lviv,
Pekarska Str., 50, Lviv,
79010, Ukraine.
Tel.: +38-050-663-52-12
E-mail: stefanyk@bigmir.net

State Biotechnological University,
Alchevskikh Str., 44, Kharkiv
61002, Ukraine.

Burlakova, O. V., Stefanyk, V. Yu., & Fedorenko, S. Ya. (2025). Assessment of 17 β -estradiol stability in domestic cat feces during repeat ELISA analysis of a single sample at a 24-hour interval. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 27(119), 119–123. doi: 10.32718/nvlvet11917

This study presents a comparative analysis of 17 β -estradiol levels in domestic cat feces using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), with respect to the duration of sample storage. Measurements were taken from the same sample at 24-hour intervals to assess hormonal stability over time. The primary objective was to evaluate the reliability of repeated hormone quantification, which is critical for accurate diagnosis of reproductive (hormonal) status in animals using fecal biomarkers. The results revealed a significant decrease in 17 β -estradiol concentration in fecal samples analyzed after a 24-hour interval, amounting to approximately 61.7 % of the initial value. This degradation may be attributed to microbial activity, enzymatic breakdown of steroid structures, or temperature fluctuations due to improper storage conditions. These findings are highly relevant for optimizing protocols for the collection and preservation of biological material, particularly in field research settings where immediate freezing of samples is often technically unfeasible. The observed decline in hormone concentration after 24 hours underscores the need to standardize post-collection sample handling procedures. Specifically, the use of preservatives or immediate cooling of samples is recommended to minimize degradation processes. When interpreting hormonal assay results, potential losses of biologically active compounds should be considered, as they may affect the accuracy of reproductive status assessments. This is especially pertinent for studies conducted under natural conditions, where access to laboratory equipment is limited and comparability between studies depends on adherence to unified sample processing standards. The data obtained are valuable for refining diagnostic protocols in veterinary reproductive medicine and feline practice.

Key words: felids, estrogens, ELISA, 17 β -estradiol, fecal analysis, biological material, endocrine diagnostics, veterinary reproductive medicine.

Оцінка стабільності рівня 17 β -естрадіолу у калі домашньої кішки при повторному ІФА-аналізі одного зразка з інтервалом 24 години

O. V. Burlakova¹, V. Yu. Stefanyk^{1✉}, S. Ya. Fedorenko²

¹Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, м. Львів, Україна

²Державний біотехнологічний університет, м. Харків, Україна

Проведені дослідження, стосовно порівняльного аналізу рівня 17 β -естрадіолу у калі домашньої кішки методом імуноферментного аналізу (ІФА) залежно від тривалості зберігання матеріалу, який досліджується з часовим інтервалом 24 години одного і того ж зразку. Метою було оцінити стабільність показників вмісту гормону при повторному вимірюванні, що має значення для точності діагностики репродуктивного (гормонального) статусу тварин за фекальними біомаркерами. У результаті проведених досліджень встановлено суттєве зниження концентрації 17 β -естрадіолу у фекальних зразках при їх аналізі з інтервалом 24 го-

дин, що становить приблизно 61,7 % від вихідного рівня. Така деградація може бути зумовлена мікробіологічною активністю, ферментативним розпадом стероїдних структур, або впливом температурних коливань при неналежному зберіганні. Отримані результати мають суттєве значення для оптимізації протоколів збору та зберігання біологічного матеріалу, особливо в умовах польових досліджень, де негайне заморожування зразків часто є технічно неможливим. Встановлене зниження концентрації 17 β -естрадіолу при дослідженні матеріалу з інтервалом 24 години вказує про необхідність стандартизації процедур поводження із зразками після їх збору. Зокрема, рекомендовано застосування консервантів, або охолодження зразків одразу після збору з метою мінімізації деградаційних процесів. При інтерпретації результатів гормонального аналізу варто враховувати потенційні втрати біологічно активних сполук, що можуть впливати на точність оцінки репродуктивного статусу тварин. Це особливо актуально для досліджень, що проводяться у природних умовах, де доступ до лабораторного обладнання обмежений, а порівнянність між дослідженнями залежить від дотримання єдиних стандартів обробки зразків. Отримані дані мають значення для оптимізації діагностичних протоколів у ветеринарній репродуктології та у фелінологічній практиці.

Ключові слова: котяті, естрогени, ІФА, 17 β -естрадіол, фекальний аналіз, біологічний матеріал, ендокринна діагностика, ветеринарна репродуктологія.

Вступ

Відповідно до звіту Всесвітнього фонду дикої природи (WWF Living Planet Report 2022), з 1970 року по сьогодні у світі спостерігається скорочення популяції хребетних тварин на 69 %.

У сучасному світі проблема збереження біорізноманіття набуває критичного значення. Особливо гостро постає питання захисту видів, що перебувають на межі зникнення. Серед них – представники родини котячих, які відіграють важливу роль у функціонуванні екосистем, але дедалі частіше опиняються під загрозою повного зникнення.

Причини цього явища багатогранні: від втрати природного середовища існування через урбанізацію та вирубку лісів – до браконьєрства, зміни клімату та зниження генетичного різноманіття. Зменшення чисельності тварин є не лише екологічною проблемою, а й моральним викликом для людства. На сьогоднішнє питання збереження видів тварин, що перебувають під загрозою зникнення, набуває особливої актуальності та викликає занепокоєння серед наукової спільноти та природоохоронних організацій.

Одним із ключових аспектів успішного планування заходів щодо збереження та розмноження (як природного, так і штучного) є точне визначення фази статевого циклу самок та оптимального часу для осіменіння. У котячих фолікулярну фазу та еструс зазвичай ідентифікують на основі вагінальної цитології, рівня естрадіолу у крові, а також поведінкових ознак. Проте варіативність проявів статевих фаз, а також можливість розвитку супутніх патологічних процесів, що впливають на діагностичні показники, зумовлюють потребу у використанні додаткових методів контролю.

Дослідження (Lokutoff et al., 1983; Steven et al., 1991; Palme et al., 1996; de Catanzaro et al., 2004; Brown, 2006) засвідчують ефективність неінвазивного моніторингу репродуктивного статусу шляхом визначення рівня естрогенів не лише у крові, а й у сечі та фекаліях. Зокрема, у представників котячих стероїдні гормони екскретуються з фекаліями, що робить цей метод найбільш зручним, безпечним та інформативним для дослідження диких тварин. Також таким методом дослідження дозволить уникнути стресових реакцій, пов'язаних із інвазивними процедурами, такими як забір крові, що є критично важливим у контексті охорони видів, чутливих до зовнішніх впливів.

Естрогени відіграють ключову роль не лише у регуляції репродуктивної функції, але й у підтриманні загального фізіологічного гомеостазу, зокрема через вплив на антиоксидантний статус, метаболічну стабільність та адаптаційні механізми організму. У низці досліджень, продемонстровано, що порушення гормонального балансу у тварин за репродуктологічної патології супроводжується змінами прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу, що може бути маркером системної дестабілізації (Skliarov et al., 2021). Їхня дія охоплює антиоксидантний захист організму, вплив на стан серцево-судинної системи, кісткової тканини, а також на психоемоційний баланс. Такий широкий спектр біологічної активності зумовлює актуальність дослідження естрогенів у контексті як репродуктивної, так і загальної ветеринарної ендокринології.

Естріол є найменш біологічно активним представником групи естрогенів. Він утворюється шляхом 16 α -гідроксильовання естроу (E1) і в період вагітності синтезується у значних кількостях плацентою (Cui et al., 2013). Естріол сприяє підтримці гестації та виконує важливу роль у запуску нормальної родової діяльності.

Естрадіол (E2), або 17 β -естрадіол (C₁₈H₂₄O₂), є основним статевим гормоном самок. Його синтез відбувається переважно в яєчниках, де кілька типів клітин у складі гонад забезпечують прояв овуляції протягом статевого циклу. Крім того, незначна кількість естрадіолу продукується наднирковими залозами, жировою тканиною самок, а також сім'яниками у самців, що свідчить про його системну значимість.

Мета дослідження

Оцінити стабільність концентрації 17 β -естрадіолу у фекаліях домашньої кішки при повторному імуноферментному аналізі (ІФА) одного і того ж зразка з часовим інтервалом 24 години, з метою визначення точності методу для оцінки репродуктивного здоров'я, потенціалу до відтворення та його застосування у ветеринарній діагностиці.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили в умовах кафедри акушерства, гінекології та біотехнології відтворення тварин імені Галини Зверевевої та лабораторій Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького.

При дослідженні використовували фекальні зразки від клінічно здорових домашніх кішок, породи Мейн-Кун ($n = 6$) репродуктивного віку, які на момент відбору матеріалу не перебували у стадії еструсу. Тварин утримували в ідентичних умовах, без доступу до екзогенних гормональних препаратів, при штучно-му освітленні більше 10 годин.

Проби фекалій збирали безпосередньо протягом однієї години після акту дефекації тварин, зберігали у контейнерах та негайно заморожували при -18°C до моменту проведення ІФА (Palme et al., 2013; Brown et al., 2016). Для оцінки стабільності гормону 17β -естрадіолу використовували один і той самий зразок, який аналізували двічі з інтервалом 24 години.

Перед аналізом зразки розморожували 2 години при кімнатній температурі, гомогенізували та піддавали екстракції за допомогою метанолу (80 %). Екстракти центрифугували, після чого використовували ІФА.

Після першого дослідження проби розміщали у холодильнику при температурі $+4^{\circ}\text{C}$, а через 24 години знову діставали і проводили повторне визначення рівня гормону. Для визначення рівню естрадіолу ви-

користували GRG тести виробництва Німеччини, на обладнанні фірми Awareness technology inc.

Для визначення біометричних показників тварин використовували спеціалізоване програмне забезпечення, яке забезпечує точність вимірювань та стандартизовану обробку даних. Застосування комп'ютерних програм дозволило автоматизувати процес аналізу, зменшити ймовірність помилок та забезпечити репрезентативність отриманих результатів.

Результати та їх обговорення

При проведенні досліджень, показники рівня 17β -естрадіолу фіксували в одиницях пікограм/мілілітр. Для перерахунку одиниць вимірювання у нанограм/грам, отримані показники множили на фактор 0,02 (отримані данні множили на 20 та ділили на 1000).

Результати досліджень наведені на графічних зображеннях вмісту 17β -естрадіолу у фекальних зразках кицьок, з інтервалом 24 години (рис. 1). При цьому встановлено, що у всіх 6 кицьок, рівень естрадіолу, який визначали повторно через 24 години був суттєво нижчий.



Рис. 1. Графічні зображення вмісту 17β -естрадіолу у фекальних зразках кицьок, з інтервалом 24 години

У зв'язку з обмеженим обсягом вибірки, було прийнято рішення перевірити нормальність розподілу отриманих даних перед застосуванням параметричних методів. Для цього було використано тест Шапіро–Вілка, який дозволяє оцінити відповідність емпіричного розподілу нормальному. Аналіз проводився за допомогою програмного забезпечення *JASP*, версії 18.3.0 (Нідерланди). Описова статистика та результа-

ти тесту нормальності Шапіро–Вілка для рівнів 17 β-естрадіолу, визначених методом імуноферментного аналізу та повторно виміряних на тих самих фекальних зразках домашніх кішок через 24 години, середні значення, стандартні відхилення, межі варіації, коефіцієнти асиметрії та р-значення тесту нормальності для кожної кицьки наведені у [таблицях 1 та 2](#).

Таблиця 1

Описова статистика з результатами тесту нормальності Шапіро–Вілка для вмісту 17 β-естрадіолу у зразках фекалій кицьок, з інтервалом 24 години

Descriptive Statistics												
	Roza 1	Roza 2	Gaby 1	Gaby 2	Britny 1	Britny 2	Sakura 1	Sakura 2	Bella 1	Bella 2	Xena 1	Xena 2
Valid	19	19	20	20	19	19	13	13	12	12	13	13
Mean	100.019	59.957	101.815	64.290	85.661	60.202	90.665	52.674	100.340	59.608	88.812	54.412
Std. Deviation	9.664	3.437	12.250	8.505	15.361	8.607	9.698	5.145	10.410	5.640	12.726	7.516
Shapiro-Wilk	0.960	0.973	0.927	0.964	0.928	0.934	0.900	0.924	0.916	0.959	0.955	0.891
P-value of Shapiro-Wilk	0.569	0.833	0.134	0.630	0.157	0.207	0.136	0.284	0.258	0.764	0.673	0.099
Minimum	84.056	53.978	85.850	50.352	66.382	46.556	76.116	43.792	85.242	48.356	61.942	39.330
Maximum	117.122	65.948	125.958	81.408	112.008	72.964	110.680	62.454	115.146	68.410	108.738	63.272

Згідно даних [таблиці 1](#) тест Шапіро–Вілка показав високі значення коефіцієнта (від 0,934 до 0,983), що дозволяє зробити висновок про відсутність статистично значущих відхилень від нормального розподілу. Розподіл даних у всіх групах є близьким до нормального (Shapiro–Wilk $P > 0.05$), що дозволяє застосову-

вати параметричні методи статистичного аналізу. Відсутність значної асиметрії та викидів підтверджує якість вибірки та надійність отриманих результатів.

Коефіцієнти кореляції та величина P при порівнянні даних вмісту 17 β-естрадіолу у зразках фекалій кицьок, з інтервалом 24 години наведено у [таблиці 2](#).

Таблиця 2

Коефіцієнти кореляції та величина p при порівнянні даних вмісту 17 β-естрадіолу у зразках фекалій кицьок, з інтервалом 24 години

Показники	Тварини					
	Roza	Gaby	Britny	Sakura	Bella	Xena
Pearson's r	0,872	0,693	0,619	0,907	0,605	0,891
P	0,001	0,001	0,005	0,001	0,037	0,001

Згідно даних [таблиці 2](#) необхідно відмітити, що у всіх випадках спостерігається позитивна кореляція між першим і другим вимірюванням, тобто рівень 17 β-естрадіолу має певну стабільність навіть після зберігання дослідного матеріалу протягом 24 годин.

Крім того, результати проведених досліджень вказують суттєве зниження концентрації 17 β-естрадіолу у фекальних зразках при дослідженні з інтервалом 24 годин, що становить приблизно 61,7 % від вихідного рівня. Така деградація може бути зумовлена мікробіологічною активністю, ферментативним розпадом стероїдних структур, або впливом температурних коливань при неналежному зберіганні.

Згідно даних досліджень ([Huang et al., 2022](#)), естрогени мають тенденцію до фотодеградації під дією ультрафіолетового випромінювання. Згідно з отриманими даними ([Ma et al., 2015](#)), при експозиції світлом з довжиною хвилі 253,7 нм та інтенсивністю 350 μW/cm² протягом 50 хвилин рівень 17 β-естрадіолу може знижуватись до 68 % від початкового значення. Це може бути одним із чинників зниження концентрації гормону на другий день, оскільки дослідження проводилися при денному освітленні поблизу вікна.

Другим потенційним механізмом деградації є окиснення естрадіолу. Як зазначено у дослідженнях ([Fishman et al., 1960](#); [Perondi et al., 2020](#)), одним із шляхів трансформації 17 β-естрадіолу є його окиснення з утворенням естроли та води. Враховуючи, що зразки перебували у відкритих пробірках понад годину, метанол у розчині міг абсорбувати кисень з навколишнього середовища, сприяючи цьому процесу.

Ще одним можливим фактором є мікробна деградація естрадіолу та його метаболітів. Оскільки дослідження не проводилося в стерильному середовищі з використанням стерильного обладнання, наявність бактерій могла також спричинити додаткове розщеплення стероїдних сполук. Подібні механізми описані у роботах [Terio et al. \(2002\)](#) та [Möstl et al. \(2005\)](#).

Отримані результати мають суттєве значення для оптимізації протоколів збору та зберігання біологічного матеріалу, особливо в умовах польових досліджень, де негайне заморожування зразків часто є технічно неможливим. Встановлене зниження концентрації 17 β-естрадіолу при дослідженні матеріалу з інтервалом 24 години свідчить про необхідність стандартизації процедур поводження із зразками після їх збору. Зокрема, рекомендовано застосування консер-

вантів, або охолодження зразків одразу після збору з метою мінімізації деградаційних процесів.

Висновки

Встановлено зниження концентрації 17 β -естрадіолу у фекаліях домашньої кішки при повторному імуноферментному аналізі одного і того ж зразка з часовим інтервалом 24 години, що становить приблизно 61,7 % від вихідного рівня.

При інтерпретації результатів гормонального аналізу слід враховувати потенційні втрати біологічно активних сполук, що можуть впливати на точність оцінки репродуктивного статусу тварин. Це особливо актуально для ендокринологічних досліджень, що проводяться у природних умовах, де доступ до лабораторного обладнання обмежений, а порівняльність між дослідженнями залежить від дотримання єдиних стандартів відібраних зразків.

Відомості про конфлікт інтересів

Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів.

References

- Brown, J. L. (2006). Comparative endocrinology of domestic and non-domestic felids. *Theriogenology*, 66(1), 25–36. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.03.011.
- Brown, J. L., Walker, S., & Steinman, K. (2016). Endocrine manual for reproductive assessment of domestic and non-domestic species. Front Royal, Virginia: Smithsonian's National Zoological Park, Conservation & Research Center.
- Cui, X., Jing, X., Wu, X., Wang, Z., & Li, Q. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends in Molecular Medicine*, 19(3), 197–209. DOI: 10.1016/j.molmed.2012.12.007.
- de Catanzaro, D., Muir, C., Beaton, E. A., & Jetha, M. (2004). Non-invasive repeated measurement of urinary progesterone, 17 β -estradiol, and testosterone in developing, cycling, pregnant, and postpartum female mice. *Steroids*, 69(10), 687–696. DOI: 10.1016/j.steroids.2004.07.002.
- Fishman, J., Bradlow, H. L., & Gallagher, T. F. (1960). Oxidative Metabolism of Estradiol. *Journal of Biological Chemistry*, 235(11), 3104–3107. DOI: 10.1016/s0021-9258(20)81317-9.
- Huang, F., Gao, F., Li, C., & Campos, L. C. (2022). Photodegradation of free estrogens driven by the UV light: Effects of operation mode and water matrix. *Science of The Total Environment*, 155515. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.155515.
- Lokutoff, N. M., Ott, J. E., & Lasley, B. L. (1983). Strategies for assessing ovarian function in exotic species. *Journal of Zoo and Animal Medicine*, 14(1), 3–12. DOI: 10.2307/20094620.
- Ma, X., Zhang, C., Deng, J., Song, Y., Li, Q., Guo, Y., & Li, C. (2015). Simultaneous Degradation of Estrone, 17 β -Estradiol and 17 α -Ethinyl Estradiol in an Aqueous UV/H₂O₂ System. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(10), 12016–12029. DOI: 10.3390/ijerph121012016.
- Möstl, E., Rettenbacher, S., & Palme, R. (2005). Measurement of Corticosterone Metabolites in Birds' Droppings: An Analytical Approach. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046(1), 17–34. DOI: 10.1196/annals.1343.004.
- Palme, R., Fisher, P., Schildorfer, H., & Ismail, M. N. (1996). Excretion of infused 14C-steroid hormones via feces and urine in domestic livestock. *Animal Reproduction Science*, 43(1), 43–63. DOI: 10.1016/0378-4320(95)01458-6.
- Palme, R., Touma, C., Dominchin, M., & Lepschy, M. (2013). Steroid extraction: Get the best out of faecal samples // *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 100, 238–246. URL: https://www.wtm.at/explorer/WTM/Archiv/2013/WTM_09-10-2013_Artikel_3_Palme.pdf.
- Perondi, T., Michelon, W., Junior, P. R., Knoblauch, P. M., Chiareloto, M., de Fátima Peralta Muniz Moreira, R., Peralta, R. A., Düsman, E., & Pokrywiecki, T. S. (2020). Advanced oxidative processes in the degradation of 17 β -estradiol present on surface waters: kinetics, byproducts and ecotoxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(17), 21032–21039. DOI: 10.1007/s11356-020-08618-2.
- Skliarov, P., Fedorenko, S., Naumenko, S., Onyshchenko, O., Pasternak, A., Roman, L., Lieshchova, M., Bilyi, D., & Bobrytska, O. (2021). Reviewing effective factors of alimentary deficiency in animals reproductive functions. *World's Veterinary Journal*, 11(2), 157–169. DOI: 10.54203/scil.2021.wvj21.
- Steven, L. M., Caroline, M., & David, E. W. (1991). Urinary steroid metabolic profiles in female Pere David's deer (*Elophurus davidianus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 22(1), 75–78. URL: <http://www.jstor.org/stable/20095121>.
- Terio, K. A., Munson, L., Moore, P. F., & Marker, L. (2002). Comparison of different methods for evaluating stress in cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Zoo Biology*, 21(1), 33–50. DOI: 10.1002/zoo.10008.