

## **Исследования сезонной экскреции тестостерона у самцов манула (*Otocolobus manul*) в Московском зоопарке**

***Е.Ю. Ткачева, И.А. Алексеичева, О.Б. Лифанова***  
**Московский зоопарк**

Манул (*Otocolobus manul*), мелкий представитель семейства кошачьих, обитающий в Центральной Азии, редко бывает представлен в коллекциях зоопарков. Это, учитывая также определенные проблемы при содержании и разведении манулов в неволе, придает любым исследованиям этих животных, и особенно, долгосрочным исследованиям их репродуктивной функции, большое научное и научно-практическое значение. Однако получение данных о сезонных изменениях гормонального статуса содержащихся в зоопарках животных затруднено из-за невозможности регулярных, повторяющихся в течение длительного времени отборов проб крови, необходимых для проведения гормонального анализа. Эта проблема во многих случаях успешно решается с помощью бесконтактного мониторинга экскреции стероидных гормонов с фекалиями или с мочой, что позволяет получить адекватное представление о состоянии животного, не подвергая его при этом постоянному стрессированию (Brown et al., 1996; Brown, Wildt, 1997; Graham, 2004).

Метод бесконтактного мониторинга экскреции стероидных гормонов давно и успешно применяется для исследования репродуктивного статуса как самцов, так и самок различных видов кошачьих, в том числе и манулов, включая диагностику беременности (Brown et al., 1996; Swanson et al., 1996; Brown, Wildt, 1997; Tkacheva et al., 2000; Brown et al., 2002). Экскреция стероидных гормонов у манулов, как и у остальных видов кошачьих, происходит в основном с фекалиями. Известно, что фекальные андрогены выводятся из организма кошачьих в виде метаболитов (Brown et al., 1996), при этом свободный тестостерон практически отсутствует. Однако на практике часть водорастворимых метаболитов тестостерона успешно определяется методами радиоиммунного (РИА) либо иммуноферментного (ИФА) гормонального анализа с использованием стандартных коммерческих наборов для определения свободного тестостерона в сыворотке крови (Brown et al., 1996). Это существенно упрощает технику проведения мониторинга гормональной активности, позволяя определять динамику экскреции, вести сезонные наблюдения, не прибегая к трудоёмким и дорогостоящим определениям вида метаболита и подбору специфической антисыворотки для него.

Целью нашего исследования было не только изучение динамики экскреции тестостерона с фекалиями у самцов манула в течение длительного времени, но, также, сравнение гормональных функций двух самцов, один из которых был болен сахарным диабетом и в течение длительного времени не проявлял полового поведения. Поскольку в медицинской практике хорошо известна взаимосвязь между уровнем общего тестостерона в плазме и развитием сахарного диабета 2-го типа у мужчин (Bhatia et al., 2006; Chandel et al., 2008), нам также представлялось интересным проследить возможную связь уровня фекального тестостерона с уровнем сахара в крови больного диабетом манула.

#### Материалы и методы

Исследования проводились с двумя самцами манула: самец Ричард, 2002 г.р., рожденный в неволе, регулярно проявлял половое поведение, спаривался, однако детенышей от него получено не было. Самец Рыжик, рожденный в естественных условиях и содержащийся в Московском зоопарке с 1999 г., успешно принимал участие в размножении. С 2005 г. этот самец был болен сахарным диабетом и находился на инсулиновой терапии. С момента начала заболевания он не проявлял внешних признаков половой активности.

Исследования динамики экскреции тестостерона с фекалиями проводились в период с апреля 2007 по апрель 2008 г. (самец Ричард) и с февраля 2007 г. по апрель 2008г. (самец Рыжик). Животные содержались в уличных вольерах при естественном освещении. Во время проведения исследований самец Ричард ссаживался с самкой в период с 10 января по 11 марта, причём в период с 19 по 22 января наблюдались спаривания. Самец Рыжик в период исследований с самкой не ссаживался.

Сбор фекальных проб проводили 1-2 раза в неделю. Пробы фекалий замораживали при  $-18^{\circ}\text{C}$  и хранили до анализа в замороженном состоянии.

Перед проведением экстракции пробы высушивали при  $+35^{\circ}\text{C}$ , высушенные пробы измельчали с помощью фарфоровой ступки. Экстракцию проводили 90%-ным этиловым спиртом по методике, описанной Брауном и Вилдтом (Brown, Wildt, 1997). При этом 500 мг фекалий заливали 5 мл 90% этанола и тщательно перемешивали. Смесь центрифугировали при 2500 об/мин в течение 10 минут, после чего экстракт отделяли, а осадок заливали 5 мл 90% этанола и перемешивали в течение 30 сек. Смесь повторно центрифугировали при 2500 об/мин в течение 10 минут, после чего вторая порция надосадочной жидкости прибавлялась к первой. Полученный экстракт выпаривали досуха и растворяли в 1 мл 90% этилового спирта.

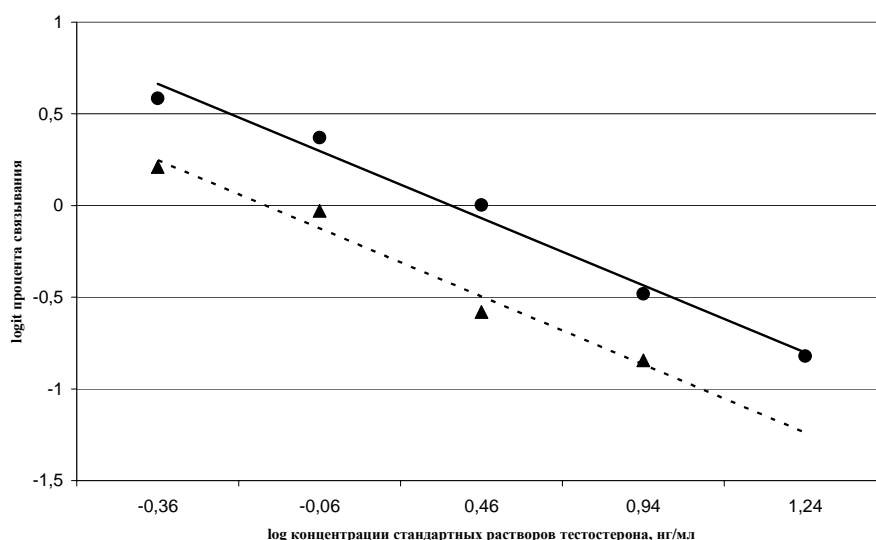
Для проведения иммуноферментного анализа применяли стандартные наборы реагентов для иммуноферментного определения тестостерона в

сыворотке крови производства фирмы «НВО Иммунотех» (Россия), предназначенные для определения содержания соответствующих гормонов методом твердофазного иммуноферментного анализа. ИФА проводили на базе биохимической лаборатории Московского зоопарка с использованием микропланшетного спектрофотометра вертикального сканирования EIA multi-well Reader II (США). Промывку микропланшет проводили на микропланшетном промывочном устройстве фирмы SIGMA Diagnostics (США).

Определения уровня сахара в крови у самца Рыжика проводили с периодичностью 2-3 раза в месяц. Кровь брали из уха, анализ проводили с помощью глюкометра Accu-check active (Roche Diagnostics, Германия).

#### Результаты и их обсуждение

Для проверки адекватности применяемой методики гормонального анализа был проведён тест на параллелизм калибровочных кривых, полученных при анализе стандартных образцов соответствующего гормона, и кривых, полученных при определении гормонов в серии разведений экстрактов фекалий (Герлинская и др., 1993; Harper, Austad, 2000; Palme, 2005). Параллельность соответствующих кривых показывает отсутствие неспецифического связывания применяемых при анализе антител с посторонними соединениями, присутствующими в фекальных экстрактах. На рис. 1 показаны кривые связывания стандартных растворов тестостерона и разведений фекальных экстрактов в logit-log координатах. Коэффициент корреляции составляет 0,99 ( $p < 0,05$ ). Проценты связывания рассчитывали, как отношение оптической плотности, соответствующей каждой пробе, к оптической плотности, соответствующей стандартной пробе, не содержащей тестостерон.

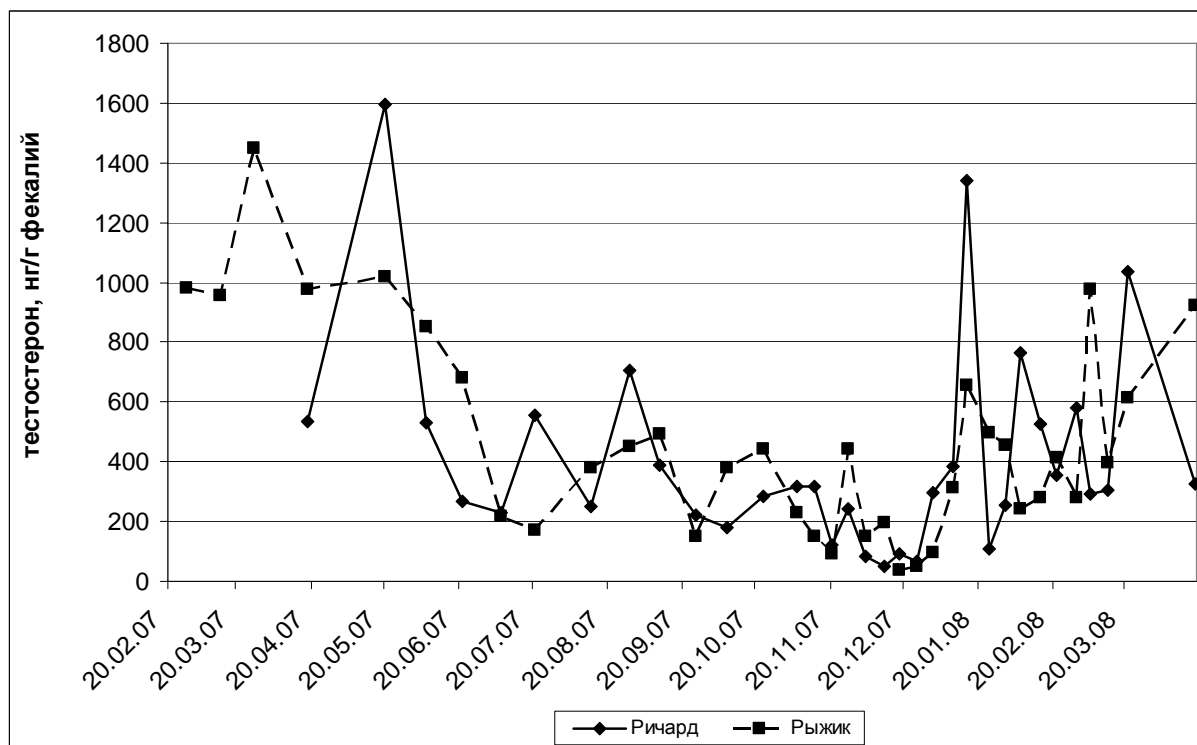


**Рисунок 1.** Тест на параллелизм по тестостерону у манулов. Стандарты  $y = -0,3661x + 1,0294$  (сплошная линия), образцы фекалий  $y = -0,3714x + 0,618$  (пунктирная линия).

На рис. 1 видно, что тест на параллелизм для тестостерона показал достаточную степень соответствия выбранной методики.

В дальнейшем для проведения анализа тестостерона в фекалиях самцов манулов экстракты фекальных проб разводились фосфатным буфером pH 7,2 в соотношении 1:10.

На рис. 2 показаны результаты мониторинга фекального тестостерона у самцов манулов.



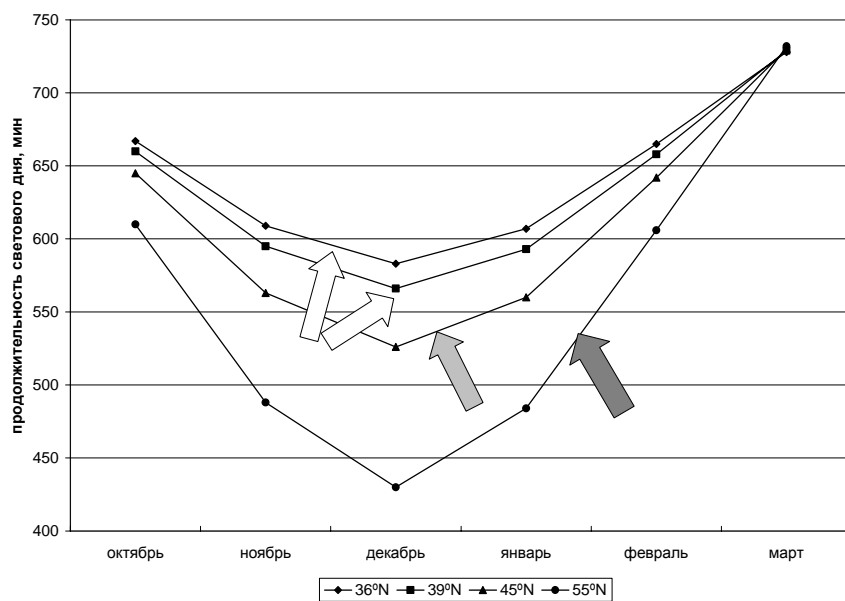
**Рисунок 2. Динамика сезонной экскреции тестостерона у самцов манулов.**

Из рис. 2 видно, что подъём гормональной активности у обоих самцов наблюдался со второй половины января по май.

Известно, что манулы имеют четко выраженную сезонную активность в размножении (Swanson et al., 1996; Brown et al., 2002). Исследования, проводившиеся с манулами в неволе, показывают, что осенью у самцов увеличивается вес (Демина, 2006), наблюдается повышенный уровень концентрации тестостерона в крови, повышается продуцирование и качество спермы (Swanson et al., 1996; Brown et al., 2002). В период времени с января по март наблюдается половая активность и эструс у самок (Tkacheva et al., 2000; Brown et al., 2002). По некоторым данным (Brown et al., 2002) подъём концентрации фекальных андрогенов у самцов манулов наблюдается в период с ноября по апрель. При этом авторы указывают, что репродуктивная активность самцов манула жёстко связана с длиной светового дня. В условиях естественного освещения у самцов манулов в период с декабря по апрель наблюдается повышение гормональной активности, которую оценивали по изменениям уровня андрогенов и лютеинизирующего гормона

в крови, данным электроэякуляции, весу тела и объёму семенников (Swanson et al., 1996).

Полученный нами результат несколько расходится с данными большинства зарубежных авторов: очевидно, что подъём фекального тестостерона у самцов манулов в Московском зоопарке начинается на 1 – 1,5 месяца позже, чем у других, подвергавшихся аналогичным исследованиям, животных этого вида. При этом наблюдавшиеся нами сроки репродуктивной активности совпадают с данными, полученными для самцов манулов в помещении при искусственном освещении, имитирующем естественный фотопериод (Newell-Fugate et al., 2007). В этой работе авторы объясняли отсрочку начала сезона размножения различными географическими положениями зоопарков, в которых проводили исследования и, как следствие, различными величинами светового дня. Так, например, у домашних кошек в умеренных широтах смещение широты на 5-10° может сдвигать начало и окончание сезона размножения на 1-2 месяца (Hurni, 1981).



**Рисунок 3. Продолжительность светового дня на географических широтах 36, 39, 45 и 55° северной широты. Белыми стрелками показано время начала подъёма андрогенов у содержащихся в зоопарках манулов по данным разных авторов, светло-серой стрелкой - время начала сезона размножения у манулов в естественных условиях (в Монголии, приблизительная широта – 45° N), тёмно-серой стрелкой – время начала подъёма тестостерона у манулов в Московском зоопарке.**

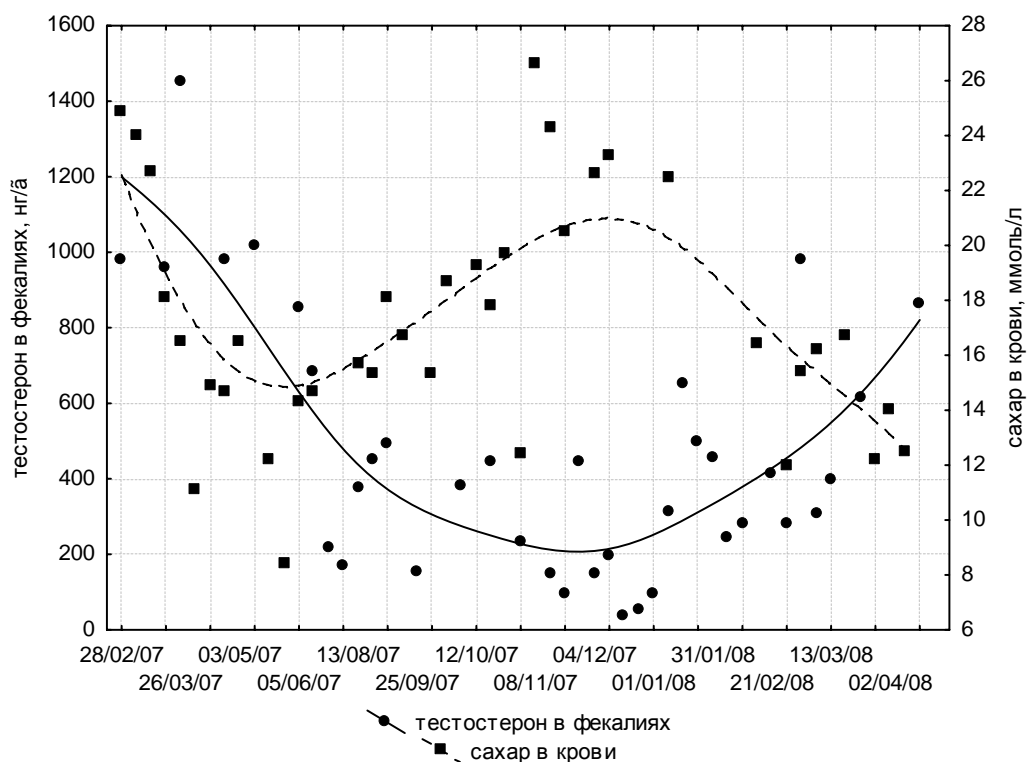
Действительно, исследования с манулами, во время которых начало подъёма уровня тестостерона у самцов было отмечено в ноябре, проводили в Северной Каролине на широте 36°N (Newell-Fugate et al., 2007). На рис. 3 показана продолжительность светового дня в осенний и зимний период на

разных географических широтах и начало сезона размножения у самцов манулов по данным разных авторов.

Исходя из этих данных, можно предположить, что репродуктивная активность самцов манулов определяется не только определённой минимальной длиной светового дня, но и фактом его возрастания. В местах естественного обитания манула начало сезона размножения приурочено к началу возрастания светового дня, при этом продолжительность светлого времени суток составляет около 9 часов и достигается практически сразу после зимнего солнцестояния. В условиях Московского зоопарка продолжительность светового дня 9 часов достигается во второй половине января. В этот период наблюдается начало репродуктивной активности манулов. При этом такая же продолжительность светового дня достигается на широте Москвы и в конце октября, а на широте центральных районов Монголии – приблизительно в середине декабря. Однако в этот момент сезон размножения не наступает, возможно, в связи с тем, что день всё ещё продолжает сокращаться. Что касается зоопарков, находящихся в пределах географических широт 36-39°N, там даже в самый короткий день года продолжительность светового дня превышает 9 часов. Если предположить, что эта величина является некой критической точкой, то наступление сезона размножения здесь определяется исключительно минимальной величиной светового дня и, практически, приурочено к этому моменту. Однако, поскольку приведённых данных слишком мало для того, чтобы сделать окончательные выводы, этот вопрос нуждается в уточнении.

Анализируя рисунок 2, видим, что максимальный уровень тестостерона у самца Ричарда составлял 1595 нг/г фекалий (16 мая), у Рыжика – 1450 нг/г фекалий (26 марта). Высокий уровень фекального тестостерона наблюдался у Ричарда в период спариваний (1342 нг/г фекалий). Фоновый уровень тестостерона в период времени с июня по начало января составлял от 50 до 700 нг/г фекалий у Ричарда и от 40 до 500 нг/г фекалий у Рыжика. Согласно медицинским наблюдениям (Bhatia et al., 2006; Chandel et al., 2008), дефицит андрогенов может вызывать возрастание концентрации сахара в крови больных диабетом людей, так же, как высокий уровень сахара может повлечь за собой андрогенную недостаточность. По медицинским исследованиям известно, что у мужчин, больных сахарным диабетом, уровень тестостерона на 10–15% ниже, чем у здоровых людей тех же возрастных групп. Такая же разница (примерно на 10%) между двумя самцами наблюдается в нашем случае при высоких уровнях тестостерона. При фоновых концентрациях гормона разница почти в 2 раза выше (20-30%). Сезонность динамики уровня тестостерона у обоих самцов выражена четко.

На рис. 4 представлен общий профиль сезонных изменений концентрации сахара в крови больного диабетом самца Рыжика и экскреции тестостерона с фекалиями.



**Рисунок 4. Общий профиль сезонных изменений концентрации сахара в крови больного диабетом самца Рыжика (пунктирная линия) и экскреции тестостерона с фекалиями (сплошная линия), построенный по методу наименьших квадратов.**

Чёткой корреляции между уровнем тестостерона в фекалиях и уровнем сахара в крови обнаружить не удалось, хотя в период репродуктивного покоя концентрация сахара показывала отчётливый рост. Вероятно, животным с ярко выраженной сезонной цикличностью гормональной продукции, каковыми являются манулы, подобная корреляция не свойственна, поскольку и пиковый, и фоновый уровень тестостерона являются нормой для организма.

#### Выводы

1. Период репродуктивной активности, определяемый по величинам экскреции тестостерона с фекалиями, наблюдается у самцов манулов в Московском зоопарке с конца января по май. Такое сравнительно позднее начало репродуктивного сезона может объясняться особенностями естественного фотопериода на географической широте Москвы.

2. Сезонное повышение экскреции тестостерона наблюдалось как у здорового самца, так и у самца, больного диабетом, и не проявлявшего признаков полового поведения.

3. Корреляция между уровнем сахара в крови больного диабетом самца манула и уровнем экскреции тестостерона с фекалиями отсутствует.

#### Список литературы

- Герлинская Л.А., Мошкин М.П., Евсиков В.И. 1993. **Методические подходы к оценке стрессированности диких млекопитающих** // Экология. №1. С. 97 - 99.
- Демина Т.С. 2006. **Сезонность активности поведения, потребности в кормах, изменения массы тела манулов (*Felis (Otocolobus) manul manul*)** // Кормление диких животных: Межвед. сб. научн. и научн.-метод. тр. Московский зоопарк. С. 123 - 126.
- Bhatia V., Chaudhuri A., Tomar R. 2006. **Low testosterone and high C-reactive protein concentrations predict low hematocrit in type 2 diabetes** // Diabetes Care. V.29 9(10). P. 2289 - 2294.
- Brown J.L., Terio K.A., Graham L.H. 1996. **Fecal androgen metabolite analysis for non invasive monitoring of testicular steroidogenic activity in felids** // Zoo Biology №15. P. 425 - 434.
- Brown J.L., Wildt D.E. 1997. **Assessing reproductive status in wild felids by noninvasive faecal steroid monitoring** // Int. Zoo Yb. V. 35. P. 173 - 191.
- Brown J.L., Graham L.H., Wu J.M., Collins D., Swanson W.F. 2002. **Reproductive endocrine responses to photoperiod and exogenous gonadotropins in the pallas' cat (*Otocolobus manul*)** // Zoo Biol. № 21. P. 347 - 364.
- Chandel A., Dhindsa S., Tohiwala S., Chaudhuri A., Dandona P. 2008. **Testosterone Concentration in Young Patients With Diabetes** // Diabetes care. V.31(10). P. 2013 - 2017.
- Harper J.M., Austad S.N. 2000. **Fecal Glucocorticoids: A Noninvasive Method of Measuring Adrenal Activity in Wild and Captive Rodents** // Physiol. Biochem. Zoology. V. 73(1). P. 12 - 22.
- Hurni H. 1981. **Day length and breeding in the domestic cat** // Lab. Anim. №15. P. 229 - 233.
- Graham L.H. 2004. **Non-invasive monitoring of reproduction in zoo and wildlife species** // Annual Review of Biomedical Sciences. V.6. P. 91 - 98.
- Newell-Fugate A., Kennedy-Stoskopf S., Brown J.L., Levine J.F., Swanson W.F. 2007. **Seminal and Endocrine Characteristics of Male Pallas' Cats (*Otocolobus manul*) Maintained Under Artificial Lighting With Simulated Natural Photoperiods** // Zoo Biology. № 26. P. 187 - 199.



- Palme R. 2005. **Measuring fecal steroids: guidelines for practical application** // Annals of the New York Academy of Sciences. V. 1046. P. 75 - 80.
- Swanson W.F., Brown J.L., Wildt D.E. 1996. **Influence of seasonality on reproductive traits of the male Pallas' cat (*Felis manul*) and implications for captive management** // J. Zoo Wild. Med. V.27. P. 234 - 240.
- Tkacheva E.Y., Lifanova O.B., Alekseicheva I.A. 2000. **Non-invasive monitoring of ovarian function and pregnancy in Pallas's cats by means of faecal steroids** // International Zoo News V. 47(5). P. 301 - 307.

### **Summary**

*Tkacheva E.Yu., Alekseicheva I.A., Lifanova O.B. Study on seasonal testosterone excretion in males of Pallas' cat (*Otocolobus manul*) in Moscow zoo.*

We studied excretion of testosterone in two manul males which were kept in Moscow zoo (with natural photoperiod). To determine concentration of testosterone in animals' faeces we used EIA-method. Period of reproductive activity caused by testosterone increase was revealed from the end of January till May, may be due to peculiarities of photoperiod in Moscow latitude. Testosterone excretion in the male with diabetes was seasonal though he did not show sexual behavior. Level of blood glucose did not correlated with level of testosterone excretion in that male.

*Источник:* Научные исследования в зоологических парках// Выпуск 25  
Москва 2009. С. 93-101