

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Vaida
SURVILIENĖ

Pilkųjų ruonių (*Halichoerus grypus*)
socialinės elgsenos vystymasis
ir steroidinių hormonų pokyčiai
ankstyvosios ontogenezės laikotarpiu

DAKTARO DISERTACIJOS SANTRAUKA

Gamtos mokslai,
Biologija (N 010)

VILNIUS 2022

Disertacija rengta 2013–2022 metais Vilniaus universitete.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslų taryba (stipendija už akademinis pasiekimus (DOK-17066)), IDEAWILD (įrangos įsigijimas <http://www.ideawild.org/>, JAV), Society for Marine Mammalogy (Grant in Aid of Research, 2013, JAV), Natural Environment Research Council (NERC).

Mokslinis vadovas – prof. dr. Osvaldas Rukšėnas (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Moksliniai konsultantai:

dr. Kimberley Bennett (Abertay universitetas, Dundee, Didžioji Britanija, gamtos mokslai, biologija – N 010).

dr. Patrick Pomeroy (Sea Mammal Research Unit, Scottish Oceans Institute, University of St Andrews, Didžioji Britanija, gamtos mokslai, biologija - N 010)

Gynimo taryba:

Pirmininkė – doc. dr. Inga Griškova-Bulanova (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija - N 010).

Nariai:

dr. Elizabeth Burgess (Anderson Cabot vandenyno tyrimo centras (Bostonas, JAV), gamtos mokslai, biologija - N 010),

doc. dr. Ramunė Griškienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija - N 010),

doc. dr. Mindaugas Mitkus (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija, N 010),

prof. dr. Alius Ulevičius (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, ekologija ir aplinkotyra - N 012).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2023 m. sausio mėn. 20 d. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R-401 auditorijoje ir/ arba nuotoliniu būdu. Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva, tel. +37052234377; el. paštas phd@gmc.vu.lt.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

VILNIUS UNIVERSITY

Vaida
SURVILIENĖ

Social development and changes
in steroid hormones during early
ontogenesis of grey seals
(*Halichoerus grypus*)

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biology (N 010)

VILNIUS 2022

The dissertation was prepared between 2013 and 2022 in Vilnius University. The research was supported by Research Council of Lithuania (scholarship for academic accomplishments (DOK-17066)), IDEA WILD (equipment support <http://www.ideawild.org/>, USA), Society for Marine Mammalogy (Grant in Aid of Research, 2013, USA), Natural Environment Research Council (NERC).

Academic supervisor – Prof. Habil. Dr. Osvaldas Rukšėnas (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010)

Academic consultants:

Dr. Kimberley Bennett (Abertay University, Dundee, UK, Natural Sciences, Biology – N 010)

Dr. Patrick Pomeroy (Sea Mammal Research Unit, Scottish Oceans Institute, University of St Andrews, UK, Natural Sciences, Biology - N 010)

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Assoc. Prof. Inga Griškova – Bulanova (Vilnius University, Natural Sciences, Biology - N 010).

Members:

Dr. Elizabeth Burgess (Center for Ocean Life at the New England Aquarium (Boston, USA), Natural Sciences, Biology - N 010),

Assoc. Prof. Dr. Ramunė Grikšienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology - N 010),

Assoc. Prof. Dr. Mindaugas Mitkus (Vilnius University, Natural Sciences, Biology - N 010).

Prof. Dr. Alius Ulevičius (Vilnius University, Natural Sciences, Ecology and Environmental Sciences - N 012),

The dissertation shall be defended at a public/closed meeting of the Dissertation Defence Panel on 20th of January 2022 in Room R-401 of the Life Sciences Center. Address: Saulėtekio av. 7, Vilnius, Lithuania, Tel. +37052234377; e-mail: phd@gmc.vu.lt.

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University as well as on the website of Vilnius University: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

ĮVADAS.....	6
1. PILKŪJŲ RUONIŲ SOCIALINIO ŽAIDIMO ELGSENOS STEBĖJIMAI NEVEISIMOSI LAIKOTARPIU	11
1.1. METODAI.....	11
1.2. REZULTATAI.....	20
1.3. DISKUSIJA	27
2. STEROIDINIŲ HORMONŲ TYRIMAI	31
2.1. METODAI.....	31
2.2. REZULTATAI.....	45
2.3. DISKUSIJA	55
3. IŠVADOS.....	60
LITERATŪROS SĄRAŠAS	61
TRUMPOS ŽINIOS APIE DISERTANTĄ.....	71

ĮVADAS

Pilkųjų ruonių, kaip ir kitų jūrinių žinduolių gyvybinių ir demografinių parametrų pokyčius lemiantys fiziologiniai veiksniai, pavyzdžiui, individo energijos balansas, sveikata ir elgsena, yra svarbūs rodikliai jūrinės ekosistemos augimo ir būklės vertinimui (Benoît ir kt., 2011; Donoghue ir Boutin, 1995; Hall ir kt., 2001; Haller ir kt., 1996; Lang ir kt., 2011; Pavitt ir kt., 2014; Vincent ir kt., 2005). Pilkieji ruoniai taip pat yra viena iš trijų Baltijos jūros ruonių rūšių, reguliariai stebima Lietuvos pajūryje ir įtraukta į saugomų Lietuvos rūšių sąrašą (Balčiauskas, 2021). Nors prieš 50 metų šių žinduolių populiacija pasaulyje, o ypač Baltijos jūroje, buvo labai sumažėjusi, paskutinį dešimtmetį ji sparčiai auga ir daro nemažą įtaką žuvininkystei (Bowen, 2018; Harding ir Härkönen, 1999). Tačiau ruonius vis dar veikia tokie antropogeniniai aplinkos veiksniai, kaip urbanizacija, povandeninis triukšmas ir maistinių medžiagų poreikvojimas (Bowen, 2018; Hastie ir kt., 2014). Negana to, prie neigiamo poveikio prisideda ir klimato kaita, dėl kurios pilkųjų ruonių veisimosi metu mažėja jūros ledo dangos plotas ir storis, ruoniai yra priversti veistis sausumoje (Jüssi ir kt., 2008; Meier ir kt., 2004). Dėl padidėjusio individų tankio veisimosi vietose išauga suaugusių individų tarpusavio agresija (Bishop ir kt., 2015), greičiau plinta infekcinės ligos (Puryear ir kt., 2016), jaunikliai priauga mažiau kūno masės ir krenta jų išgyvenamumo rodikliai (Hall ir kt., 2002, 2001; Jüssi ir kt., 2008). Užterštumas endokrininę sistemą ardančiomis cheminėmis medžiagomis tiek Atlanto vandenyne, tiek ir Baltijos jūroje gali lemti neigiamus fiziologinius ir elgsenos pokyčius (Czerska ir kt., 2013; Jenssen, 2006, 1996; Sørmo ir kt., 2003). Todėl svarbu gerai suprasti pačių pilkųjų ruonių elgseną ir ją veikiančius veiksnius, kad būtų galima numatyti ir tinkamai prognozuoti neigiamų aplinkos ir įvairių stresorių poveikį jų populiacijos dinamikai.

Pilkieji ruoniai yra socialūs žinduoliai. Poravimosi metu patinai siekia susiporuoti su didesniu patelių skaičiumi, taip padidindami savo reprodukcinį sėkmingumą, ir tam naudoja įvairias strategijas ir taktikas, taip pat pasižymi individualiu elgsenos variabilumu (Bishop

ir kt., 2015; Boness ir James, 1979; Twiss, 1991). Suaugę patinai poruotis pradeda tik sulaukę vidutiniškai 10 metų, pasiekę reikalingą kūno masę (Twiss, 1991) ir/ ar, remiantis kitų ruonių tyrimais, įgiję patirties (Harcourt ir kt., 2007), tačiau kaip ir kada ta patirtis įgyjama pilkųjų ruonių tarpe nėra tirta.

Socialinis žaidimas – tai dominuojantis socialinės elgsenos tipas, pasireiškiantis ankstyvojo žinduolių vystymosi periodu. Daugelio mokslininkų jis laikomas viena iš pagrindinių sąlygų daugeliui žinduolių kaupti fiziologinę ir socialinę patirtį bei gerinti kognityvines funkcijas (Burghardt, 2005; Pellis ir kt., 2010; Pellis ir Iwaniuk, 1999). Jaunų pilkųjų ruonių socialinė elgsena, ypač ne veisimosi periodu, yra labai mažai ištirta (Wilson, 1974) ir beveik nieko nežinoma apie veiksnius, turinčius įtakos jų socialiniam žaidimui, jo vietai ir pobūdžiui, žaidžiančių individų amžinė ir lytinė struktūra.

Burghardt'o žaidimo pertekliaus teorija (Burghardt, 2005) teigia, kad socialinis žaidimas vyksta tik esant užtektinai energetinių resursų ir saugioje aplinkoje, todėl didžiosios dalies žinduolių žaidimo elgsena pasireiškia žindymo metu ir atjunkymo pabaigoje, prižiūrint tėvams. Vis dėlto pilkųjų ruonių žindymas vidutiniškai trunka tik 18 dienų, o jaunikliai atjunkomi staigiai, motinai pasitraukus į jūrą maitintis, ir pereina į laikino badavimo periodą, kurio metu lieka veisimosi teritorijoje, nesimaitina ir yra mažai socialiai aktyvūs (Kovacs, 1987; Kovacs ir Lavigne, 1986), tad kada įvyksta pilkųjų ruonių socializacija, nėra žinoma. Neporavimosi sezonu pilkieji ruoniai į sausumą išsilaipina kailio keitimui, termoreguliacijai ir poilsiui (Bowen, 2018). Gulyklose poilsiui pilkieji ruoniai buriasi į dideles grupes, taip vadinamus „haulouts“, kurių pagrindinė funkcija, manoma, yra greitesnės informacijos apie pavojų gavimas (da Silva ir Terhune, 1988; Wolf ir kt., 2007). Remiantis Burghardt'o žaidimo pertekliaus teorija buvo iškelta hipotezė, kad gulyklos grupės dydis yra svarbus faktorius nesiveisiančių jaunų pilkųjų ruonių individų socialinio žaidimo elgsenai ir dažniui, o žaidimo sąveikų skaičius turėtų teigiamai koreliuoti su grupės dydžiu, o pats žaidimas turėtų atspindėti elgseną, būdingą poravimosi sezonui.

Žuvimi mintantys jūriniai žinduoliai yra ypač jautrūs endokrininę sistemą trikdančioms medžiagoms, kurios imituoja arba blokuoja normalią hormone veiklą (Fossi ir Marsili, 2003). Šie endokrininę sistemą trikdančios medžiagos veikia imituodamos įvairius, dažniausiai steroidinius, hormonus prisijungdamos prie šių hormonų receptorių ar kitaip paveikdami hormonų veikimo kelius ląstelėje. Steroidai yra aktyvūs lipofiliniai hormonai, panašiai veikiantys visų žinduolių fiziologiją (Handa ir Weiser, 2014; Ruiz-Cortes, 2012; Solano ir Arck, 2020), taip pat ir socialinio žaidimo elgseną (Auger ir Olesen, 2009; Meaney ir Stewart, 1981; Olesen ir kt., 2005). Steroidiniai hormonai, ypač lytiniai, yra jautrūs jūroje dažnai sutinkamų polichlororganinių medžiagų poveikiui (Fossi ir Marsili, 2003). Nors lytinių steroidinių hormonų lygis nesubrendusiuose individuose yra mažesnis nei suaugusiuose, jie gali būti aptinkami ir, manoma, vaidina svarbų vaidmenį elgsenos formavimuisi bei normaliam energetinių resursų paskirstymui, ypač ankstyvojo vystymosi metu po gimimo (Bell, 2018). Tipinių pilkųjų ruonių jaunikliams būdingų steroidinių hormonų koncentracijų nustatymas gali padėti geriau įvertinti ankstyvąją fiziologinę ir elgseninę pilkųjų ruonių vystymąsi bei jų poveikį nuo lyties priklausančiai pirmų metų išgyvenimo tikimybei (Hall ir kt., 2001) ir elgsenos formavimuisi (Breed ir kt., 2009; Carter ir kt., 2019, 2017; Trippel ir kt., 1996; Twiss ir kt., 2012). Nors kortizolio koncentracijos jau buvo matuotos atjunkytų jauniklių tarpe tiriant streso įtaką energetinių resursų pokyčiams (Bennett ir kt., 2012, 2013; Nordøy ir kt., 1990), jokie gliukokortikoidų tyrimai nebuvo daryti žindomų jauniklių tarpe. Taip pat nebuvo tirtos androgenų ir estrogenų koncentracijos šios rūšies žindomų ir atjunkytų jauniklių tarpe.

Darbo tikslas

Ištirti jaunų pilkųjų ruonių (*Halichoerus grypus*) socialinės elgsenos bei steroidinių hormonų, kaip vieno iš elgseną veikiančių veiksnių, koncentracijų pokyčius ankstyvosios ontogenezės laikotarpiu.

Darbo uždaviniai

1. Identifikuoti žaidžiančių individų neporavimosi sezonu lytį ir amžių bei socialinio žaidimo elgsenos elementus.
2. Nustatyti, kaip elgsena susijusi su pilkųjų ruonių grupės dydžiu ir lytine/ amžine sudėtimi.
3. Ištirti seilių tinkamumą pilkųjų ruonių steroidinių hormonų tyrimams.
4. Įvertinti komercinių ELISA rinkinių tinkamumą pilkųjų ruonių seilių ir kraujo plazmos tyrimams, skirtingų matricų skiriamąją gebą bei kelių skirtingų kraujo plazmos steroidams tirti skirtų analizės metodų suderinamumą tarpusavyje.
5. Palyginti pilkųjų ruonių jauniklių elgsenos ir steroidų koncentracijų priklausomybę žindymo ir badavimo laikotarpiais.

Mokslinis naujumas

1. Identifikuoti pilkųjų ruonių jauniklių socialinio žaidimo sausumoje elementai grupės formavimosi metu ne veisimosi sezonu.
2. Nustatyta, kad seilės yra tinkama pilkųjų ruonių jauniklių steroidų analizės matrica, tačiau jos tinkamos naudoti tik nelaisvės sąlygomis, nes pats surinkimo metodas nėra pakankamai efektyvus ir „neinvazinis“ naudojimui natūralioje gamtoje.
3. Pirmą kartą skirtingais metodais nustatytos žindomų ir atjunkytų pilkųjų ruonių jauniklių lytinių steroidų koncentracijos.
4. Gautos tipinės anksčiau nenustatytos pilkųjų ruonių gliukokortikoidų koncentracijų vertės ankstyvuojų vystymosi periodu naudojant UPC₂-MS/MS.
5. Rastos pirmos sąsajos tarp gliukokortikoidų (11-deoxycortisolio, kortikosterono, 11-deoxykortikosterono) ir jauniklių elgsenos žindymo ir badavimo periodais.

Tyrimo aktualumas ir praktinė svarba

1. Sukurta išsami pilkųjų ruonių socialinio žaidimo elgsenos etograma, kurią galima pritaikyti ir modifikuoti tiriant pilkųjų ruonių socialinį žaidimą kituose kontekstuose.

2. Pateiktos žinios apie ribotą seilių tinkamumą laukinių pilkųjų ruonių steroidų tyrimams renkant šiuos mėginius laisvės sąlygomis.
3. Įvardinta galimybė naudoti seiles steroidų, tokių kaip estradiolis, kortizolis ir galbūt progesteronas, tyrimams nelaisvėje su dresuotais pilkaisiais ruoniais ir galbūt kitomis irklakojų rūšimis.
4. Pritaikytas jautrus UPC₂-MS/MS metodas, skirtas vienu metu aptikti kelis steroidus, kuris ateityje galės būti naudojamas pilkųjų ruonių ir kitų jūrų žinduolių steroidų koncentracijų nustatymui.
5. Nustatyti tipiniai pilkųjų ruonių jauniklių steroidinių hormonų kiekiai ir kitimas, kurie galėtų būti naudojami kaip atskaitos taškas tolimesniems tyrimams.
6. Pilotinių tyrimų metu gautos sąsajos tarp steroidinių hormonų ir jauniklių elgsenos suteikia galimybę nuodugniau tirti šiuos procesus ateityje.

1. PILKŪJŲ RUONIŲ SOCIALINIO ŽAIDIMO ELGSENOS STEBĖJIMAI NEVEISIMOSI LAIKOTARPIU

1.1. METODAI

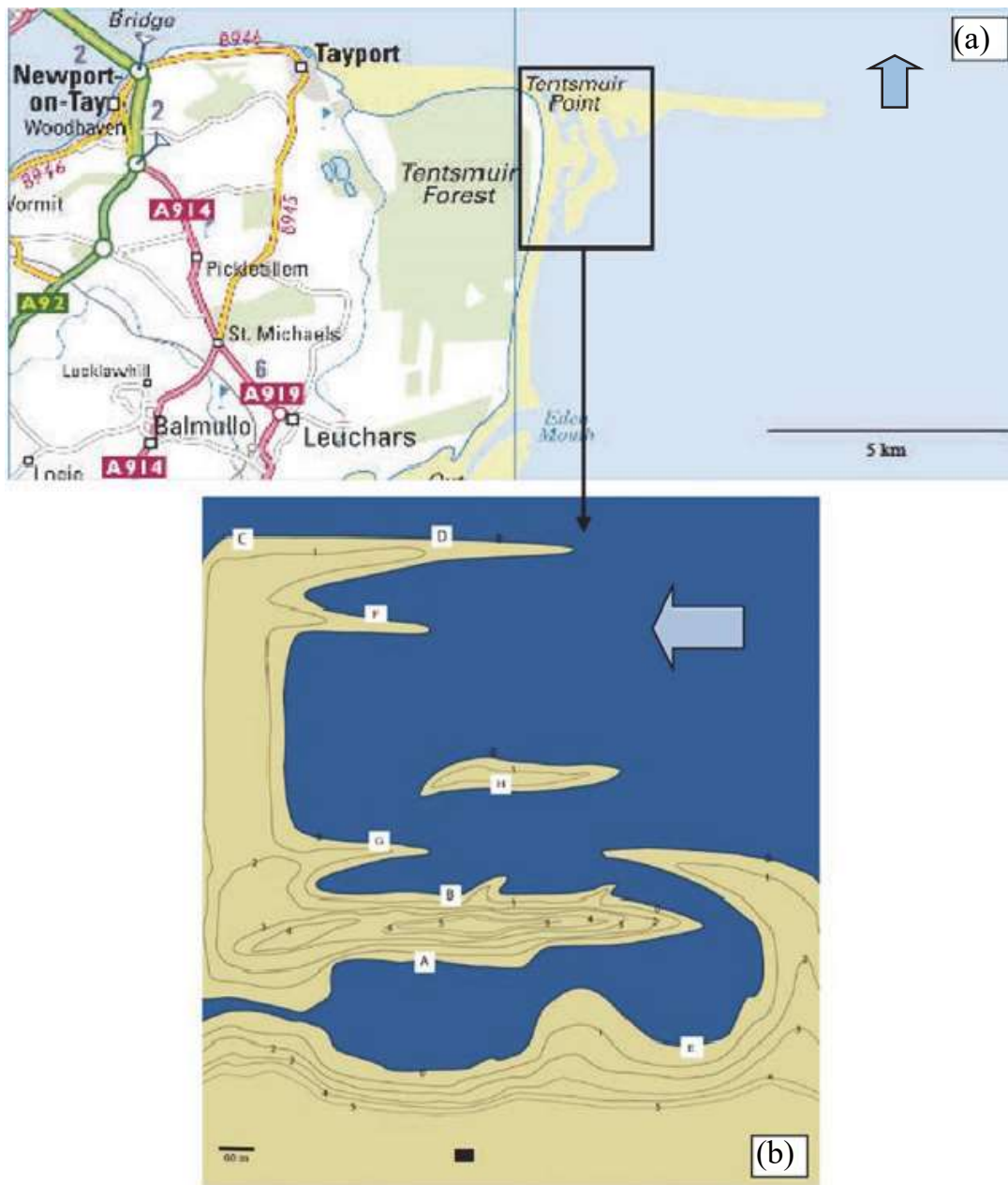
1.1.1. Tyrimo vieta ir tyrimo objektas

Tyrimas atliktas Tentsmuir nacionaliniame gamtos rezervate (angl. *Tentsmuir National Nature Reserve*) rytinėje Škotijos pakrantėje (56.43, -2.80). Atoslūgio metu iškylančios smėlio seklumos tapdavo pilkųjų ruonių gulyklomis, kuriose ruoniai išsilaipindavo poilsiui (1a ir b pav.).

Tyrimo metu pilkieji ruoniai buvo priskirti tam tikrai amžiaus ir lyties grupei pagal matomus išorinius lytinius požymius, pvz., lytinių organų angas, kūno dydį, antrinius lytinius požymius bei kailio dėmėtumo dimorfizmą (Davies, 1957; Hewer, 1964). Lytinių organų angos, leidžiančios tiksliai nusakyti lytį, buvo matomos apie 20 % stebėjimo atvejų (see Kenyon ir Maxwell, 1969). Jei lytiniai organai nebuvo matomi, lytis būdavo priskiriama remiantis išoriniais antriniais lytiniais požymiais bei kailio dėmėtomu ir spalva (apie 80 % visų atvejų). Suaugę patinai yra stambesni nei suaugusios patelės ir pasiekia apie 250 cm ilgį bei 350 kg svorį. Tuo tarpu patelės užauga iki 200 cm ilgio ir sveria iki 250 kg (Boness ir James, 1979; Bowen, 2018). Patelių kailis dažniausiai yra šviesiai pilkas su išsimėčiusiomis juodomis dėmėmis, tuo tarpu patinų kailis – praktiškai juodas, t. y. tamsios dėmės susiliejusios tarpusavyje. Taip pat tarpas tarp vyriškos lyties individų akių yra didesnis, snukis platus, užsibaigiantis rieta nosimi. Tuo tarpu patelių kaklas siauras, snukis trumpesnis ir tiesesnis, tarpas tarp akių siauresnis (Hall ir Russell, 2018).

1.1.2. Amžiaus ir lyties nustatymas

Išskirtos trys pilkųjų ruonių amžiaus grupės: (1) suaugę (> 10 metų), (2) paaugliai (4-10 metų) bei (3) jaunikliai (< 4 metai). Patinai stambiu, plačiu ir randais nusėtu sprandu, kaklu bei pečiais buvo priskirti suaugusiems (M A). Mažesni patinai, turintys siauresnį kaklą



1 pav. (a) Stebėjimų vieta (www.streetmap.co.uk); ir (b) schematinis gulklos vaizdas. Juodos linijos žymi apytikslį vandens lygį; skaičiai – laiką iki/po atoslūgio (0), kurio metu seklumos dalis (šviesiai ruda spalva) pasiekia maksimalų plotą virš vandens (mėlyna spalva). Atskiros sausumos pilkųjų ruonių gulyklų vietas pažymėtos raidėmis A-H. Juodas kvadratas – žymi apytikslę slėptuvės, iš kurios buvo vykdomi stebėjimai, vietą.

nusėtą vos keliais randais, rodančiais, kad jie rečiau kovėsi dėl patelių, buvo priskirti prie paauglių (Sub M). Akivaizdžiai besilaukiančios patelės buvo laikomos suaugusiomis (F A), tuo tarpu paauglės patelės (Sub F) pasižymėjo plokštesne pilvine dalimi ir buvo sąlyginai mažesnės. Visi maži individai su neišreikštais antriniais lytiniais požymiais buvo laikomi jaunikliais (Juv) (King, 1983). Jauniklių lytis nebuvo nustatoma. Paaugliai bei jaunikliai kartu buvo laikomi jaunais individais. Nesant galimybės nustatyti suaugusių ar paauglių amžiaus ar lyties, ruoniai buvo priskirti prie „nežinomų“ (Unkn).

1.1.3. Stebėjimo procedūra

Elgsenos stebėjimai vyko 2009 metais nuo birželio 5 iki rugpjūčio 6 šviesiu paros metu (7 – 21 val.). Viso analizei panaudota 107 valandos stebėjimų medžiagos. Stebėjimų pradžia ir trukmė priklausė nuo oro sąlygų bei potvynių-atoslūgių laiko. Stebėjimai nebuvo vykdomi esant rūkui ar artimiausiai ruonių grupei nutolus daugiau nei 400 m. Stebėjimams naudoti Bushnell žiūronai (8 × 32 mm), Optictron HR80 teleskopas (× 20 to 60) bei duomenų lapai elgsenos registravimui. Stebėjimai derinti su video medžiagos registravimu, kuriam buvo naudota Sony Handycam (DCR-SR36) kamera su × 40 optiniu priartinimu, ×200 skaitmeniniu priartinimu bei 40 GB vidiniu kietuoju disku. Stebėjimai vykdyti iš medinės slėptuvės, nutolusios nuo artimiausios gulyklos A apie 200-300 m ir apie 10 m nuo potvynio aukščiausios vandens ribos (1b pav.). Elgsenai ir kitiems kintamiesiems registruoti naudoti du stebėjimo metodai:

Sknavimo metodas (Altmann, 1974; Martin ir Bateson, 1993) buvo naudojamas rinkti informaciją apie artimiausios gulyklos A (1b pav.) lytinę ir amžinę struktūrą bei žaidžiančių individų skaičių. Stebėjimai vykdyti 15 min. intervalais, kurių metu registruota data, paros laikas, apytikslis pilkųjų ruonių skaičius, jų lytis ir amžius bei socialinių sąveikų, kurias stebėjimo metu sudarė du žaidžiantys individai (diados), skaičius. Stebėjimai prasidėdavo iškart stebėtojai atvykus į slėptuvę. Dėl pusiau vandeninio socialinio žaidimo pobūdžio ir trumpos sknavimo proceso trukmės (iki 1-2 min.), ne

visada buvo galima nusakyti tikslią žaidžiančių individų lytį ir amžių, todėl šis indikatorius nebuvo naudojamas skanavimo metodu surinktų duomenų analizei ir socialinio žaidimo skaičiaus bei dažnio pokyčiui laike vertinti.

Vandens lygio svyravimai potvynio-atoslūgio metu buvo pagrindinis ribojantis faktorius grupės formavimuisi gulyklose, kadangi ruoniai galėjo išsilaipinti į sausumą tik esant atoslūgiui. Vandens lygis ir potvynio-atoslūgio laikas registruoti naudojantis „Admiralty Easy Tide“ tinklalapio (<http://easytide.ukho.gov.uk>) prognozėmis artimiausiame stebėjimo taške (River Tay Bar, Škotija). Tiriamuoju periodu atoslūgio metu (t. y. esant 0 valandų) vandens lygis nukrisdavo iki 1,38 m virš standartinio atskaitos taško, o atoslūgio metu, maždaug $\pm 6,18$ val. nuo atoslūgio pakildavo vidutiniškai iki 4,65 m virš atskaitos taško (t. y. virš fiksuotos aukščio ribos vietinėje potvynių-atoslūgių matavimo stotyje, kur renkami visi vandens lygio svyravimų duomenys) (1b pav.). Paros laikas buvo perskaičiuojamas į nuo **atoslūgio priklausantį laiką** ir išreiškiamas valandomis iki (-)/ po (+) atoslūgio (0).

Gulyklos grupės formavimosi pradžia laikoma, kai stebėtojas galėjo stebėti bent du individus išsilaipinant į sausumą. Šie periodai buvo registruoti 15 min. intervalais nuo formavimosi pradžios (0 val.) ir apjungiami į 1 val. periodus analizės metu, vadinamuosius *grupės formavimosi periodus (HFP)*. Į grupės dydį įėjo tiek jau išsilaipinę individai, tiek sekliame vandenyje žaidžiantys.

Ad libitum stebėjimo metodas (Altmann, 1974; Martin ir Bateson, 1993) tarp skanavimų buvo naudotas detaliems žaidimo stebėjimams. Šių stebėjimų metu buvo įmanoma identifikuoti daugelio individų amžių ir lytį remiantis anksčiau išvardintais požymiais. *Ad libitum* stebėjimo metu registruoti etogramoje (1 lentelė) išvardintais elgsenos elementais, kurta remiantis ankstesniais pilkųjų ruonių jauniklių žaidimo elgsenos tyrimais (Wilson, 1974), suaugusių pilkųjų ruonių stebėjimais veisimosi periodu (Twiss, 1991) ir ankstesniais autorės stebėjimais. Elgsenos stebėjimai prasidėdavo iškart atsitiktinai pasirinkus žaidžiančių individų porą (diadą). Viso užregistruotos 84 žaidimo sąveikos (PI) (1218,44 min. arba 20,31 val.), kurias sudarė 2425

elgsenos elementai. Žaidimo elgsenos stebėjimas sustodavo, kai abu individai pasitraukdavo iš matymo lauko į vandenį arba giliai į kolonijos vidų (60 %), abu gyvūnai išsilaipindavo į sausumą (angl. *hauled out*) ir pereidavo į ramybės būseną ar užsiimdavo kita nesocialinio tipo elgsena (23,53 %), arba individams išsiskyrus, t. y. vienam išsilaipinus į sausumą, o kitam pasitraukus iš matymo lauko (16,47 %).

1 lentelė. Pilkųjų ruonių žaidimo elgsenos etograma.

Elgsenos elemento simbolis	Simbolio išplėtimas (angl. k. / liet. k.)	Platus elgsenos elemento paaiškinimas
I. Judėjimas – judėjimas nuo/ link tam tikros lokacijos ar kito individo.		
Ch	Persekioti (<i>chase</i>)	Vienas individas seka kitą.
Loc A	Judėjimas nuo individo (<i>locomotion away</i>)	Judėjimas nuo kito individo.
Loc W	Judėjimas į/ link vandens (<i>locomotion water</i>)	Judėjimas į/ link vandens.
Loc L	Judėjimas į sausumą (<i>locomotion land</i>)	Judėjimas į sausumą.
II. Inicijavimas – elgsenos elementai, kuriais inicijuojamas ar tęsiamas žaidimas jam sustojus.		
Ap	Priartėjimas (<i>approach</i>)	Vienas individas juda kito individo link, priartėja prie jo.
Mz	Prisilietimas snukiu (<i>muzzle</i>)	Vienas individas liečia kitą savo snukiu ar ūsais.
SI	Socialinis tyrinėjimas (<i>social investigation</i>)	Vienas individas stebi ir uosto kitą per nedidelį atstumą, galva šiek tiek nuleista.
III. Žaidimo pertraukimas – elgsenos elementai pertraukiantys žaidimą arba nulemiantys žaidimo pabaigą.		
A	Budrumas (<i>alert</i>)	Budrumo būseną, kai ruonio kūnas įsitempęs, kaklas ištiestas, galva stati; gyvūnas tikrina aplinką (dairosi, uodžia orą ir klausosi).

Elgsenos elemento simbolis	Simbolio išplėtimas (angl. k. / liet. k.)	Platus elgsenos elemento paaiškinimas
F	Mosavimas plaukmenimi (<i>flipping</i>)	Vienas individas žaidimo metu energingai judina plaukmenį, juo liesdamas kitą, save arba vandenį/orą (kitoje situacijoje kartais siekia nusiraminti, parodyti kitokią kryptį ar išreiškia agonistinę elgseną); trunka ilgiau nei 4 sek.
OMT	Grasinimas pražiota burna (<i>open mouth threat</i>)	Grasinimas kitam individui pražiota burna, į priekį pakeltais ūsais, dažniausiai skleidžiamas garsas.
R	Poilsis (<i>rest</i>)	Neaktyvumo periodas.
IV. Žaidimo elgsena – elgsenos elementai priskirti tiesiogiai žaidimo elgsenai.		
A. Kovos imitacijos žaidimas (angl. <i>play-fight</i>)		
BHF	Galinių plaukmenų kandžiojimas (<i>biting hind flippers</i>)	Bandytas įkasti (žaidimo metu dažniausiai žaismingai) į partnerio galinius plaukmenis.
OM (Voc)	Pražiota burna (vokalizacija) (<i>open mouth (vocalization)</i>)	Žaidimo metu gyvūnas kurį laiką laiko pražiotą burną, ūsai kartais pakelti. Nors per nuotolį garsas nebuvo girdimas, yra tikėtina, kad daugeliu atvejų jis buvo skleidžiamas.
W	Imtynės (kovos imitacija) (<i>wrestling (play-fight)</i>)	Du individai imituoja kovą, tačiau be tiesioginės tikros agresijos požymių. Tipiniu atveju jie stumdo vienas kitą kaklais ir plaukmenimis, apžioti kaklą ar imituoti kandimą.
Ro W	Sukimasis vandenyje (<i>rolling in the water</i>)	Ruonių pora sukasi apie vienas kitą vandenyje, kartais gaudo vienas kitą labai nedideliu atstumu, kartais laiko vienas kitą plaukmenimis (pvz. atsigulus ant šono). Tai tarpinis variantas tarp kovos imitacijos ir gaudynių (angl. <i>play-chase</i>), kai gyvūnas turi daugiau erdvės judėti ir apsisukti bei pakeisti pozą nei sausumoje, bet nepakankamas atstumas ir gylis, kad gyvūnai galėtų vienas nuo kito bėgti.

Elgsenos elemento simbolis	Simbolio išplėtimas (angl. k. / liet. k.)	Platus elgsenos elemento paaiškinimas
L	Smeigimas (<i>lunging</i>)	Trumpas staigus ir tiesus galvos judesys kito individo link.
B. Lytinis pobūdis		
IM	Poravimosi imitacija (<i>imitation of mating</i>)	Tiriamasis ruonis užlipa ant kito ruonio iš nugaros, kartoja dubens stūmimo judesius, panašius į kopuliaciją (tačiau ši neįvyksta), proceso metu gali įkasti ir laikyti sąveikaujančio individo kaklo odą.
Mo	Lipimas (<i>mounting</i>)	Vienas individas užlipa ant kito iš nugaros.
NB	Kaklo sukandimas (<i>neck bite</i>)	Gyvūnas apžioja, priglaudžia nosį arba švelniau sukanda kito individo kaklą.
C. Kiti žaidimo elementai		
P	Prispaudimas (<i>pinning</i>)	Vienas individas užlipa ir prispaudžia kitą individą prie žemės, dažniausiai sekant vokalizacijoms, taškymuisi, snukio prisilietimui, uostymui ar neagresyviam kandžiojimui, kaip apžiojimas.
B	Kandžiojimas (<i>bitting</i>)	Ruonis įkanda kitam ruoniui.
HS	Galvos purtymas (<i>head shaking</i>)	Energingas ruonio galvos ir kaklo, karais ir viso kūno kraipymas į šonus bei įvairiomis kryptimis.
Ro A	Ridenimasis tolyn (<i>rolling away</i>)	Ruonis juda tolyn nuo kito ruonio.
Ro B	Apsivertimas ant nugaros (<i>rolling on the back</i>)	Individas apsiverčia ant nugaros.
Ro T	Ridenimasis artyn kito individo (<i>rolling towards</i>)	Ruonis ridenasi artyn kito individo.

Didžioji dauguma užfiksuotų žaidimo elgsenos sąveikų truko mažiau nei 10 min., t. y. mediana lygi 4,52 min. (nuo 2,5 min. iki 47,25 min.). Lauko užrašai (n = 51 sąveika) buvo naudoti elgsenos elementų žaidimo metu sekos ir sudėties tyrimams. Taip pat jų metu fiksuota bendra PI

trukmė, taigi šie įrašai buvo naudojami skaičiuojant elgsenos elementų dažnį (elementai/ min.) bei dalį (%) nuo visų registruotų elementų, tuo tarpu atskirų elementų trukmė buvo vertinama tik iš video įrašų, kurie sudarė apie ketvirtadalį tyrimo medžiagos (žaidimo sąveikų $n = 26$, trukmė – 389,15 min. arba 6,49 val.). Didžioji dalis žaidimo elgsenos stebėta artimiausios gulyklos pakraščiuose: 79,11 % stebėta sekliame vandenyje (kai matoma bent 2/3 gyvūno kūno) ir 20,89 % sausumoje, dažniausiai kolonijos periferijoje. Žaidimo elgsena giliame vandenyje nebuvo registruojama dėl ribotų galimybių stebėti ir sekti gyvūnus žaidimo sąveikos metu.

1.1.4. Statistinė analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta Excel (Microsoft Office, 2018), STATISTICA (ver. 8.0.55, Statsoft Inc., USA) ir IBM SPSS Statistics Version 22 (IBM Corp., 2013) programomis, kur p reikšmės laikytos reikšmingomis, kai $\alpha = 0,05$.

Socialinės elgsenos analizė. Elgsenos duomenys, gauti naudojant *ad-libitum* registravimo metodą, buvo naudoti skaičiuojant atskirų elementų elgsenos repertuaro dalį, elementų dažnį (elementai/min.) bei trukmės dalį (%) vienos sąveikos metu. Bendra elgsenos repertuaro dalis yra tam tikros elgsenos elementų ir visų užfiksuotų skanavimo vienetų santykis, išreikštas procentais. Elgsenos elementų dažnis arba tiesiog dažnis (rate, elementai/min.) buvo apskaičiuojamas dalinant elgsenos elemento skanavimo vienetų skaičių atitinkamos žaidimo sąveikos metu iš šios sąveikos trukmės (min). Elemento trukmės dalis (%) buvo apskaičiuojama padalinus žinomą atskirų elementų trukmę vienos sąveikos metu iš tos sąveikos trukmės (min.). Medianų testas (χ^2) naudotas siekiant nustatyti skirtumus elgsenos elementų dažnio (elementai/min.) ($N = 184$) ir trukmės dalies (%) ($N = 52$) skirtumus žaidimo sąveikos metu tarp skirtingos lyties ir amžiaus individų.

Žaidimo pokyčio laiko eigoje analizė. Analizės metu naudoti absoliutaus žaidimo sąveikų skaičiaus (PI), kontaktų dažnio (CR) ir žaidžiančių individų proporcijos grupėje tam tikru laiko periodu rodikliai. CR apskaičiuotas naudojantis formule, kur y_i yra diadinių

žaidimo sąveikų skaičius, o N yra grupės skaičius tam tikru stebėjimo laiku (i):
 a particular observation time (

$$CR_i = \frac{2 \times y_i}{N_i}$$

Neparametrinės statistinės analizės metodai, pavyzdžiui, Friedmano ANOVA su Kendall reikšmingumo koeficientu (χ^2 , Kendall W), buvo naudojami siekiant palyginti skirtingos lyties ir amžiaus individų proporcijas artimiausioje A gulykloje (1b pav.) kiekvieno skenavimo metu. Mann-Whitney U testas (U) buvo naudojamas siekiant rasti reikšmingus grupės dydžio (HS) ir skirtingos lyties bei amžiaus ruonių proporcijų skirtumus nesant socialinio žaidimo sąveikų ($PI = 0$) bei esant bent vienai žaidimo sąveikai ($PI > 0$). Kruskal-Wallis testas (H) naudotas reikšmingiems gulyklos grupės dydžio (HS), skirtingos lyties ir amžiaus individų dalies (%) gulykloje, kontaktų dažnio (CR) ir žaidimo sąveikų skaičiaus (PI) skirtumams rasti gulyklos/ grupės (A) formavimosi laikotarpiu (HFP). Spearmano ranginė koreliacija (R) naudota tikrinti koreliacijos stiprumui ir reikšmingumui tarp: 1) HFP ir artimiausios gulyklos dydžio (HS), skirtingos lyties ir amžiaus individų dalies (%) grupėje, PI, CR; 2) tarp HS ir CR bei PI; 3) tarp PI ir CR; 4) tarp skirtingos lyties ir amžiaus asmenų proporcijos ir PI, CR. Rezultatai pateikiami kaip vidutinės vertės su kvartiliais (Q_1 - Q_3), nebent nurodyta kitaip.

Neigiamas binominis apibendrintas tiesinis modelis (NBGLM) su log ryšiu buvo naudojamas faktorių, turinčių reikšmingą poveikį žaidimo sąveikų (PI) skaičiui, vertinimui. Neigiama binominė regresija dažnai naudojama modeliuojant per daug į kairę nukrypusius imties kintamuosius. Modelis aprašomas supaprastinta formule:

$$PI = e^{(HS + PropF + PropM + PropSF + PropSM + PropJ + ToD + D + HFT + TRT)}$$

kur PI yra stebėtų žaidimo sąveikų skaičius, HS – gulyklos dydis (individų artimiausioje gulykloje skaičius), $PropF$ – suaugusių patelių dalis artimiausioje grupėje (%), $PropM$ – suaugusių patinų dalis artimiausioje grupėje (%), $PropSF$ – paauglių patelių dalis grupėje (%), $PropSM$ – paauglių patinų dalis grupėje (%), $PropJ$ – jauniklių dalis

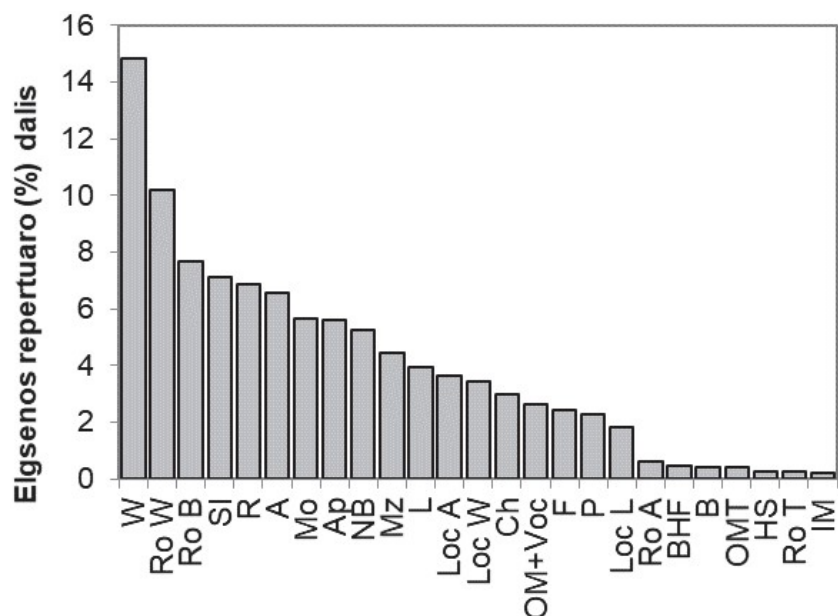
grupėje (%), ToD – paros laikas, D – data, HFT – gulyklos formavimosi laikas, TRT – nuo atoslūgio (0) priklausantis laikas, parodantis sausumos prieinamumą gulyklai formuotis. Geriausias NBGLM modelis pasirinktas pašalinus iš modelio statistiškai nereikšmingus kintamuosius ir pasirinkus modelį su mažiausia Akaike informacinio kriterijaus (AIC) reikšme. Taip pat buvo naudojamas omnibuso testas su chi-kvadratu, siekiant įvertinti, ar pasirinktas modelis yra geresnis už modelį be kintamųjų (angl. *intercept only*).

1.2. REZULTATAI

1.2.1. Socialinio žaidimo sąveikų analizė

Iš viso socialinio žaidimo diadinių sąveikų metu stebėti 168 individai. Daugiausia tai buvo paaugliai patinai (61,76 %) ir patelės (13,53 %). Rečiau stebėti suaugę patinai (10 %) ir jaunikliai (9,41 %). Suaugusios patelės sąveikų metu stebėtos nebuvo. Taip pat užfiksuoti septyni individai, kurių lytis ir amžius nebuvo nustatyti. Dažniausios sąveikos užfiksuotos tarp paauglių patinų (35 arba 41,67 %) bei tarp paauglių patelių ir patinų (18 arba 21,42 %). Suaugę patinai su paaugliais patiniais sąveikavo – 8,33 % (7 sąveikos), suaugę su suaugusiais patiniais – 2,38 % (2 sąveikos), su paauglėmis patelėmis – 4,76 % (4 sąveikos) atveju. Jaunikliai su jaunikliais – 7,14 % (6 sąv.), su vyriškos lyties paaugliais – 4,76 % (4 sąveikos), o su suaugusiais – 1,19 % (1 sąveikos) atveju. Jaunikliai su paauglėmis patelėmis nesąveikavo. Kitos sąveikos vyko su nežinomos lyties individais – 8,33 % (7 sąveikos).

17,18 % PI metu užfiksuotų elgsenos elementų priklausė žaidimo iniciacijai, 13,81 % – žaidimo pertraukimui, 8,95 % – judėjimui, o 60,06 % elgesio elementų PI metu priklausė tiesioginei žaidimo elgsenai (2 pav.). Imtynės (W), sukimasis vandenyje (Ro W), apsisvertimas ant nugaros (Ro B) ir lipimas (Mo) buvo dažniausiai stebėti elementai stebėtų žaidimų sąveikų metu.



2 pav. Elgesio elementų dalis (%) socialinių žaidimų sąveikų metu. Santrumpos paaiškintos 1 lentelėje (žr. aukščiau).

Medianų testas (MT) buvo naudojamas reikšmingiems elgsenos dažnio skirtumams (kai $p < 0,05$) įvertinti tarp skirtingos lyties ir amžiaus individų. Elgsenos dažnis (elgsena/min.) tarp skirtingų amžiaus ir lyties grupių reikšmingai skyrėsi tik imtynių (W) ($\chi^2 = 25,39$, $p < 0,001$), plaukmenų judinimo (F) ($\chi^2 = 20,34$, $p < 0,001$), judėjimo tolyn (Loc A) ($\chi^2 = 12,65$, $p = 0,01$), riedėjimo link (Ro T) kito individo ($\chi^2 = 11,77$, $p = 0,02$) bei grasinimo pražiota burna (OMT) ($\chi^2 = 9,79$, $p = 0,04$) elementams (5 lentelė). Paauglių patinų W dažnis buvo didžiausias (0,55 [0,57 (0-1,91)]), o paauglių patelių – mažiausias (0,06 [0 (0-0,5)]). Suaugę patinai ir jaunikliai W panašiai (M A: 0,24 [0 (0-1)], Juv: 0,2 [0 (0-1,19)], Unkn: 0,19 [0,17 (0-0,41)]). F elgsena dažniausiai pasireiškė tarp suaugusių patinų 0,67 (0 (0-5,56)) ir jauniklių (0,64 (0 (0-10))), o rečiausiai tarp paauglių patinų 0,04 (0 (0-2,5)) ir patelių 0,08 (0 (0-0,7)). Taip pat suaugę patinai ir nežinomi individai bei jaunikliai dažniau judėdavo nuo kito individo (Loc A, M A: 0,25 [0 (0-2,78)]; Juv: 0,15 [0 (0-0,83)]; Unkn: 0,41 [0,09 (0-2)]). Paaugliai patinai ir jaunikliai buvo linkę dažniau riedėti (Ro T) kito individo link (Sub M: 0,02 [0 (0-1)]; Juv: 0,06 [0 (0-0,83)]), tuo tarpu kitoms lyties ir amžiaus grupėms ši elgsena nebuvo užfiksuota. Agonistinė sąveika, tokia kaip OMT, buvo dažniausia

tarp suaugusių patinų (0,05 [0 (0-0,89)]), paauglių patelių (0,05 [0 (0-0,68)]) ir jauniklių (0,07 [0 (0-0,82)]), o paaugliams patinams ji praktiškai nebuvo stebima (0 [0 (0-0,05)]).

Medianų testas (MT) buvo naudojamas siekiant įvertinti reikšmingus elgsenos elemento trukmės dalies skirtumus (kai $p < 0,05$, paryškinti) tarp skirtingo amžiaus ir lyties individų. Dėl mažo imties dydžio elgsenos trukmės dalies (%) statistinė analizė buvo ribota. Tik budrumo (A) ($\chi^2 = 10,93$, $p = 0,05$) ir artėjimo (Ap) ($\chi^2 = 15,55$, $p < 0,01$) elgsenos trukmės dalis reikšmingai skyrėsi tarp skirtingos lyties ir amžiaus individų, ir abiem atvejais jauniklių ši elgsena truko ilgiausiai. Sub M budrumo (A) elgsena sudarė 0,04 (0,02 (0-0,32); $n = 54$), Sub F – 0,02 (0,01 (0,01-0,05); $n = 6$), M A – 0,01 (0,01 (0-0,03); $n = 4$), o jauniklių 0,07 (0,06 (0,04-0,14); $n = 6$) žaidimo sąveikos laiko. Sub M Ap elgsena sudarė 0,02 (0,01 (0-0,1); $n = 39$), Sub F – 0,06 (0,06 (0,03-0,08); $n = 2$), M A – 0,01 (0,01 (0,01-0,02); $n = 7$), Juv – 0,16 (0,07 (0,01-0,39); $n = 6$) žaidimo sąveikos laiko.

1.2.2. Artimiausios gulyklos duomenų kiekio analizė

Gulyklos vietos A ir B (1b pav.) buvo naudojamos dažniausiai, nes šios vietos iškildavo virš vandens pirmiausia. Pirmiausia individai išsilaipindavo gulykloje A, iš kurios į gulyklą B paprastai pasitraukdavo likus maždaug valandai ar dviem iki atoslūgio. Kitos gulyklos vietos buvo naudojamos tik 2–3 valandas prieš ir po atoslūgio pasirodžius sausumai.

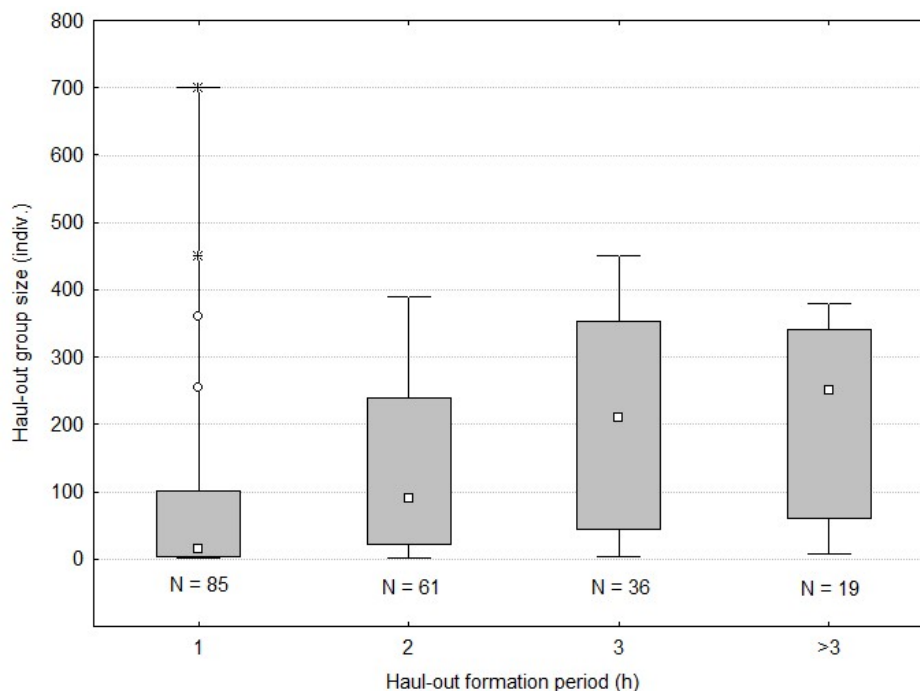
Per 21 stebėjimo dieną artimiausioje gulykloje A užfiksuoti 441 individai. Stebėjimai vykdyti 4–9 valandas per dieną. Iš šių stebėjimų 304 atvejais gulykloje stebėti bent du išsilaipinantys individai, o 137 atvejais buvo pastebėtas tik vienas arba nė vieno individo.

Stebėjimų metu artimiausioje gulykloje A buvo vidutiniškai 61,5 (nuo 7 iki 211,5) individai. Maksimalus vienu metu artimiausioje gulykloje užfiksuotų ruonių skaičius siekė 720 individų. Socialinis žaidimas stebėtas 27 % stebėjimų (kai buvo matomi du ruoniai) atvejų, tai sudarė vidutiniškai 2,22 % (0,99 - 3,53 %) pilkųjų ruonių artimiausiose gulykloje A. Vienu metu buvo užfiksuota iki devynių diadinių sąveikų.

1.2.3. Grupės dydžio įtaka kontaktų dažniui, socialinių sąveikų skaičiui ir žaidimo pokyčiui laiko eigoje

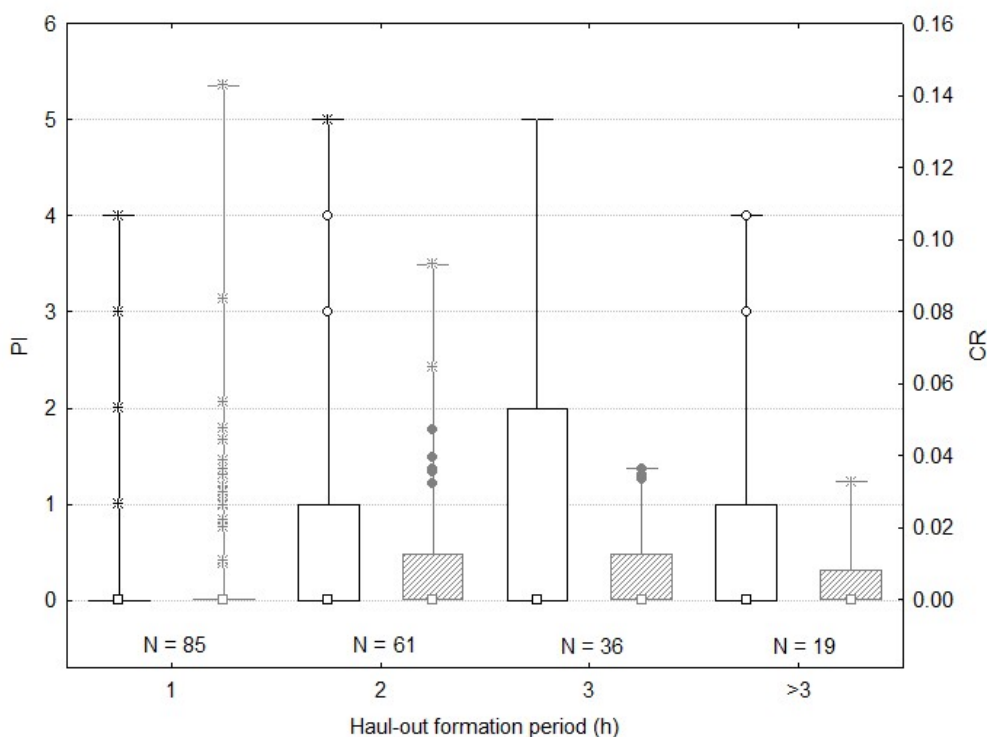
Rastas nestiprus teigiamas ryšys tarp grupės dydžio (HS) ir CR ($N = 304$, $R = 0,40$, $p < 0,001$) bei HS ir PI ($N = 304$, $R = 0,46$, $p < 0,001$). Nesant PI artimiausią ruonių grupę A sudarė 36 (6–107) individai, tuo tarpu grupės dydis siekė 220 (106–312) individų, kai buvo stebėtas bent vienas socialinis PI (MW, $N [CR = 0] = 225$, $N [CR > 0] = 79$, $U = 3\,594$, $p < 0\,001$).

Grupės formavimo procesą (HFP) gulykloje A buvo galima stebėti 19 kartų ($N = 201$ skenavimo vienetų), registruojant HS kas 15 minučių nuo bent dviejų ruonių pasirodymo sausumoje. Grupės formavimasis truko vidutiniškai 3 valandas (nuo 2,07 iki 4,44 val.). Rastas teigiamas ryšys tarp grupės dydžio ir HFP ($R = 0,5$, $p < 0,001$). Vidutinis grupės dydis pirmąją HFP valandą siekė 15 (nuo 4 iki 115), o po trečios valandos nuo grupės formavimo pradžios jis padidėjo iki 250 (nuo 60 iki 340) individų (KW, $H = 43,33$, $p < 0,001$) (3 pav.).



3 pav. Grupės dydžio (t. y. individų skaičiaus) pokytis ($H = 43,33$, $p < 0,0001$) gulyklos formavimosi laikotarpiu (HFP). Kvadratai žymi medianas; dėžutės – Q_1 - Q_2 , ūsai – min-max reikšmes, apskritimai – išskirtinius, o žvaigždutės – ekstremumus. Imties dydžiai nurodyti grafiko apačioje.

Rastas silpnas ryšys tarp CR ir HFP (Spearman, $R = 0,17$, $p = 0,018$) bei tarp PI ir HFP ($R = 0,22$, $p < 0,01$). Nepaisant mažų vidutinių verčių ir reikšmingo CR pokyčio (KW, $H = 4,52$, $p = 0,21$) HFP metu (4 pav.), antrą ir trečią HFP valandomis CR buvo didžiausias, o vėliau sumažėjo. Panašiai ir didžiausias PI buvo stebimas trečią valandą, o mažiausias – pirmą valandą (KW, $H = 8,42$, $p = 0,038$) (4 pav.).



4 pav. Žaidimo sąveikų skaičiaus (PI, balti langeliai) ir kontaktų dažnio (CR, pilki langeliai) pokytis ($H = 4,52$, $p = 0,21$) HFP laikotarpiu. Kvadratėliai žymi medianas, dėžutės – Q_1 - Q_2 , ūsai – min-max, apskritimai – išskirtiniai, o žvaigždutės - ekstremumai. Grafiko apačioje nurodytas imties dydis.

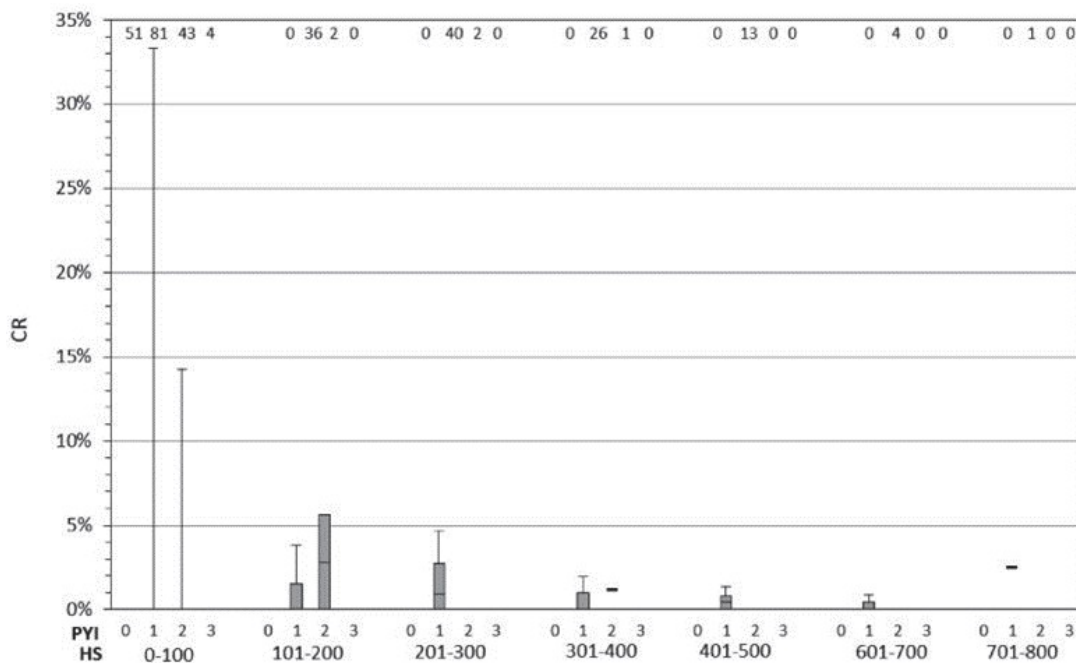
1.2.4. Grupės sudėtis ir socialinis žaidimas

Ruonių skirtingos lyties ir amžiaus individų dalis gulykloje reikšmingai skyrėsi (Friedmano ANOVA, $\chi^2 = 830,93$, $p < 0,001$; Kendall $W = 0,68$). Suaugę patinai sudarė 50 %, patelės – 31 %, paauglės patelės – 2 %, patinėliai – 10 %, jaunikliai – 4 % grupės individų skaičiaus. Vyraavo vyriškos lyties individai (t. y. paaugliai ir suaugusieji), kurie kartu sudarė 60 % grupės. Suaugusieji sudarė daugiau nei 80% individų gulykloje.

Esant žaidimo sąveikoms ($CR > 0$) ir joms nesant ($CR = 0$) reikšmingai nesiskyrė vienintelė suaugusių patinų dalis grupėje, tuo tarpu suaugusių patelių dalis reikšmingai sumažėjo (2 lentelė). Aktyviausių žaidimo metu jaunų individų (t. y. jaunikių, paauglių patinų ir patelių) dalis buvo 3 % didesnė esant žaidimo sąveikoms, nei joms nesant (2 lentelė). Didžiausias CR buvo pastebėtas grupėse, kuriose jauni individai sudarė maždaug 33–66 % grupės iš 101–200 individų (5 pav.); tuo tarpu didžiausias PI skaičius buvo užfiksuotas, kai grupės dydis siekė 201 iki 300 individų, o ją sudarė nuo 0 iki 33% jaunų individų.

2 lentelė. Lentelėje pateikta: a) skirtingų amžiaus ir lyčių grupių dalis (%), išreikšta mediana (Q_1 - Q_3), kai $CR = 0$ ($N = 225$) ir $CR > 0$ ($N = 79$) bei skirtumų tarp šių grupių statistiniai rodikliai (Mann-Whitney U testas); b) Spearman ranginės koreliacijos (R) tarp skirtingo amžiaus ir lyties individų dalies (%) artimiausioje pilkųjų ruonių grupėje ir CR rodikliai. Reikšmingi skirtumai pažymėti žvaigždutėmis (* $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$).

Dalis (%):	Kai $CR = 0$ $Q_2 (Q_1; Q_3)$	Kai $CR > 0$ $Q_2 (Q_1; Q_3)$	U	p	Spearman ranginė koreliacija
Suaugusios patelės	33,33 (18,27; 50)	28 (23,23; 34,78)	7330	0,02*	$R = -0,17$ $p < 0,01^{**}$
Suaugę patinai	48,94 (33,33; 56,14)	49,8 (46; 54,17)	7581	0,052	$R = 0,11$ $p = 0,055$
Paauglės patelės	0 (0; 4)	3,57 (2,33; 6,57)	4820	$< 0,001^{***}$	$R = 0,36$ $p < 0,001^{***}$
Paaugliai patinai	8,77 (0; 16,22)	10,87 (8,57; 14,52)	6999	$< 0,01^{**}$	$R = 0,17$ $p < 0,01^{**}$
Jaunikliai	3,59 (0; 8)	4,93 (3,04; 6,49)	7045	$< 0,01^{**}$	$R = 0,16$ $p < 0,01^{**}$



5 pav. CR skirtingo dydžio artimiausios gulyklos pilkųjų ruonių grupėse (HS, N = 304). Skaičiai PYI eilutėje po diagrama rodo skirtingas jaunų individų (PYI) proporcijas (%) artimiausioje pilkųjų ruonių grupėje: 0, 0 % (N = 51); 1, 0 iki 33 % (N = 201); 2, 33-66 % (N = 48); ir 3, nuo 66 iki 100 % (N = 4). Ūsai žymi didžiausias reikšmes; vidurio linijos – medianas; ir viršutiniai bei apatiniai stulpeliai – viršutinius ir apatinius kvartilius. Viršutiniai skaičiai rodo CR imties dydį.

1.2.5. Veiksniai, turintys įtakos kontaktų greičiui ir žaidimo sąveikų skaičiui

Geriausias modelis buvo apibūdintas 3 reikšmingais kintamaisiais (AIC = 485,25, Likelihood Ratio Chi-Square = 105,99, df = 3, p < 0,001) (3 lentelė). Žaidimų sąveikų skaičius didėjo didėjant individų skaičiui grupėje (grupės dydis) bei viso tyrimo metu (data), tačiau laikui einant mažėjo priklausomai nuo atoslūgio, t. y. didžiausias buvo atoslūgio pradžioje ir vėliau ėmė mažėti.

3 lentelė. NBGLM statistika PI (žaidimo sąveikų skaičius) veikiančių faktorių vertinimui. $B \pm SE$ – modelio koeficientas su standartine paklaida, *Lower/Upper 95% Wald CI* – apatinis ir viršutinis 95% pasikliautieji Wald testo intervalai, *Wald χ^2* – Wald chi kvadratu statistika, *df* – laisvės laipsniai. Modelis yra fiksuotas, kai $PI = 1$.

<i>Parametras</i>	$B \pm SE$	<i>Lower 95 % Wald CI</i>	<i>Upper 95 % Wald CI</i>	<i>Wald χ^2</i>	<i>df</i>	<i>p</i>
Intercept	-5572 ± 1434	- 8383,29	-2761,17	15,09	1	< 0,001
Grupės dydis	0,005 ± 0,001	0,004	0,007	53,26	1	< 0,001
Nuo atoslūgio priklausantis laikas	-0,17 ± 0,04	- 0,25	- 0,1	20,05	1	< 0,001
Data	4,14E-07 ± 1,07E-07	2,05E-7	6,22E-7	15,09	1	< 0,001

1.3. DISKUSIJA

1.3.1. Pilkųjų ruonių elgsenos žaidimo elgsenos charakteristika

Šiame tyrime pirmą kartą buvo aprašytas išsamus pilkųjų ruonių socialinio žaidimo repertuaras, kuris rodo jo svarbą ruošiantis būsimam dauginimosi sezonui. Paaugliai patinai buvo aktyviausi žaidėjai, nors jie nebuvo gausiausia lyties ir amžiaus grupė artimiausioje gulkloje. Kaip ir kitų į dideles grupes sausumoje linkusių burtis irklakojų žinduolių rūšių (Arnold ir Trillmich, 1985; Harcourt, 2010) bei laboratorinių žiurkių (Pellis ir Pellis, 1990), taip ir pilkųjų ruonių jauni vyriškos lyties individai buvo socialiesni ir daugiau laiko skyrė žaidimui nei patelės, greičiausiai dėl to, kad daugelis fizinių ir socialinių žaidimo aspektų padeda jiems pasiruošti būsimoms kovoms veisimosi periodu, tuo tarpu patelės anksti subręsta ir pasižymi mažesniu tarpusavio socialinių sąveikų skaičiumi (Pomeroy ir kt., 1999).

Kaip ir daugelyje kitų poliginija pasižyminčių kolonijinių irklakojų rūšių (Arnold ir Trillmich, 1985; Harcourt, 2010), netikros kovos arba imtynės yra vienas iš pagrindinių žaidimo elementų, stebimų pilkųjų ruonių paauglių patinų socialinio žaidimo metu. Dar svarbiau, kad socialinis žaidimas labai panašus į patinų elgseną veisimosi sezono metu (Twiss, 1991). Socialinio žaidimo metu stebėti visi pagrindiniai suaugusiems pilkiesiems ruoniams veisimosi sezono metu būdingos elgsenos elementai: imtynės, mosavimas plaukmeniu, staigus galvos ištiesimas, užpakalinių plaukmenų kandžiojimas, kandžiojimasis, socialinis tyrinėjimas ir grasinimas pražiota burna, tačiau visi elementai skyrėsi savo intensyvumu, dažniu ir elgsenos pasekmėmis.

Stebėjimų metu rastas reikšmingas skirtumas tarp skirtingo amžiaus ir lyties individų tik dar kartą įrodė žaidimo elgsenos svarbą pilkųjų ruonių paauglystės laikotarpiu. Tiek suaugę ruoniai, tiek jaunikliai pasižymėjo dvigubai mažesniu pagrindinės – imtynių – elgsenos sausumoje dažniu. Vienas iš paaiškinimų gali būti susijęs su skirtinga suaugusių ruonių socialinio žaidimo motyvacija, pvz. žiurkių gynybinė elgsena žaidimo metu yra būdinga neseniai atjunkytiems jaunikliams ir jau brandos sulaukusiems individams (Pellis ir Pellis, 1998). Remiantis kitų autorių žaidimo elgsenos tyrimais, galima teigti, kad egzistuoja jautrus vystymosi periodas, kai jauni individai pasižymi didžiausia motyvacija socialiniam žaidimui. Taip socialinis žaidimas padeda sėkmingai praktikuoti įgūdžius, svarbius prisitaikymui prie esamos aplinkos (Ikemoto ir Panksepp, 1992). Galima teigti, kad nepaisant fizinės brandos, jauni pilkųjų ruonių patinai yra labiausiai motyvuoti socialinių įgūdžių sausumoje įgijimui. Kita vertus, judėjimas sausumoje reikalauja daugiau energijos išteklių, palyginti su ruonių judėjimu vandenyje (Garrett ir Fish, 2015), tad tiek poravimosi sezono laukiantiems suaugusiems patinams, tiek aukštu metabolizmu pasižymintiems ir mažai resursų sukaupusiems jaunikliams yra svarbu taupyti energiją.

Seksualinio pobūdžio elgsenos elementai, kaip lipimas ant kito individo iš nugaros, kaklo kandžiojimas, poravimosi imitacija, dažniausiai gali būti stebimi tarp paauglių patelių ir patinų bei atkartoja

elgseną veisimosi sezono metu, o tai rodo lytinės elgsenos praktikavimo svarbą (Twiss, 1991). Tačiau, skirtingai nei tikra poravimosi elgsena, kopuliacija žaidimo metu niekada neįvykdavo, nes jaunos patelės ją visada nutraukdavo atsitraukdamos nuo vyriškos lyties partnerio, nors pats žaidimas ir nenutrūkdavo. Yra mažai žinoma, kur ir kada pilkųjų ruonių patelės yra pirmą kartą apvaisinamos. Poravimosi imitacija žaidimo metu gali būti pirmas bandymas jaunoms patelėms poruotis.

Kadangi šio tyrimo metu apsiribojome elgsenos stebėjimu sausumoje arba sekliame vandenyje, yra sunku įvertinti tikrą žaidimo dažnį, kadangi didžioji dalis žaidimo sąveikų stebėjimų pasibaigė individams pasitraukus iš stebėjimo lauko. Taigi negalima atmesti tikimybės, kad elgsena vandenyje gali sudaryti tokią pat didelę, jei ne didesnę, žaidimo elgsenos repertuaro dalį. Žaidimo elgsenos elementai, pvz., imtynės, lipimas, kaklo kandžiojimas, ridenimasis kartu ir gulėjimas ant nugaros, yra susiję su labai artimu kontaktu tarp individų, kuris tikėtina dažniau matomas sausumoje, nes žaidimas vandenyje suteikia partneriams daugiau galimybių pabėgti bei laisvės judėti. Nelaisvėje laikomų atjunkytų jauniklių socialinė sąveika prasideda persekiojimo žaidimu vandenyje, o artimam kontaktiniam žaidimui sausumoje reikia mažiausiai mėnesio (Survilienė, nepubl. duom.). Taigi tikėtina, kad pilkieji ruoniai turi įgyti socialinės patirties sklandžiai elgsenai sausumoje, nuspėti partnerio veiksmus ir galbūt net pažinoti partnerį. Tai galėtų paaiškinti mažesnę jauniklių, žaidžiančių sausumoje, dalį. Taip pat, kitaip nei vandenyje, žaisti sausumoje reikia daugiau energijos, nes tikrųjų ruonių (šm. Phocidae) judėjimas sausumoje yra ribotas (Garrett ir Fish, 2015). Tai galėjo nulemti, kad jaunikliai pasižymėjo dažnesne poilsio ir budrumo elgsena žaidimo metu, kurios metu atgaudavo jėgas.

Suaugę ir paaugliai patinai kartu sudarė apie 60 % artimiausios gulyklos grupės visu stebėjimo laikotarpiu. Panaši lytinė pilkųjų ruonių segregacija buvo stebėta ir kitose Jungtinės Karalystės vietose (Leeney ir kt., 2010; Sayer ir kt., 2012). Dažnai teigiama, kad pilkųjų ruonių segregacija atsiranda dėl tarplytinės konkurencijos ir nišos atsiskyrimo (Breed, 2008) bei nulemia skirtingą mitybą, nardymo

pajėgumus bei erdvinį paplitimą (Beck ir kt., 2003). Šios hipotezės dažnai neatsižvelgia į socialinę elgseną, kaip potencialų faktorių agregacijoms formuotis. Tačiau socialiniai veiksniai iš tiesų gali nulemti tam tikrą lytinę segregaciją sausumoje, bent jau jaunų pilkųjų ruonių tarpe, nes būtent jauni pilkųjų ruonių patinai dominuoja socialiniame žaidime. Remiantis Ruckstuhl ir Neuhaus (2002) teorijomis, socialinė sąveika, pvz., socialinis žaidimas, gali būti viena iš priežasčių, dėl kurių pilkieji ruoniai formuoja vyriškos lyties segregacijas ir kuriose turi didesnę tikimybę susitikti su potencialiais žaidimų partneriais (ir būsimais varžovais). Kadangi pilkieji ruoniai yra prieraišūs prie tam tikros konkrečios gulyklos (Sjöberg ir Ball, 2000), pasikartojančios sąveikos su tais pačiais partneriais gali nulemti ir socialinių asociacijų sudarymą.

Pagrindinis pilkųjų ruonių išsilaipinimo į sausumą tikslas yra kailio keitimas, termoreguliacija, poilsis ir, tikėtina, virškinimas (Brasseur ir kt., 1996). Individų segregacija gulykloje leidžia greičiau aptikti galimą pavojų ir tuo pat metu suteikia daugiau laiko poilsiui (Terhune ir Brilliant, 1996). Taigi pats grupės, kurią sudaro 80 % neaktyvių suaugusiųjų, dydis veikia kaip jaunų individų traukos objektas, nes užtikrina jiems saugumą. Jauniklius ir paaugles pateles, kurios yra labai atsargios ir išsilaipina į sausumą tik antrąją grupės formavimosi valandą, gali paskatinti išsilaipinti jau žaidžiantys individai krante (pvz., paaugliai patinai), nes žaidimo elgsena pažymi saugią aplinką išsilaipinimui. Tai gali būti ypač aktualu jaunoms patelėms, kurios turėjo stipriausią teigiamą koreliaciją su CR. Daugelio autorių nuomone (Pellis ir kt., 2010; Vanderschuren ir Trezza, 2013), socialinis žaidimas palengvina socialinių, kognityvinių, emocinių ir motorinių įgūdžių įsisavinimą, ypač gebėjimą lanksčiai panaudoti šiuos įgūdžius kintančioje ir sunkiai prognozuojamoje aplinkoje, o pilkųjų ruonių atveju tai gali būti dar ir vienas iš saugios aplinkos indikatorių jaunikiams ir jaunoms patelėms išsilaipinti į sausumą.

2. STEROIDINIŲ HORMONŲ TYRIMAI

2.1. METODAI

2.1.1. Tiriamasis objektas ir tyrimo vieta

Pilkųjų ruonių jauniklių seilių ir kraujo mėginiai buvo rinkami ilgamečių tyrimų (2012, 2016, 2017) ruonių veisimosi sezonu (spalio–gruodžio mėn.) metu Isle of May saloje, Škotijoje (56°11'N, 02°33'W). Mėginiai rinkti šviesiu paros metu nuo 8:02 iki 17:10 GMT (vidurkis \pm SD = 13:57 \pm 2:20). Viso surinkta 134 kraujo mėginių iš 44 jauniklių (24 patinų (n = 74) ir 20 patelių (n = 60)) iki keturių kartų (keturių mitybinių stadijų (angl. *nutritional stage*): S1 – ankstyvo žindymo, S2 – vėlyvo žindymo, W1 – ankstyvo badavimo, W2 – vėlyvo badavimo) žindymo ir badavimo periodais. Mėginiai rinkti gyvūnams esant 4–38 dienų amžiaus. Iš šių kraujo mėginių 122 buvo panaudoti tolimesnei analizei. Pirmas mėginys būdavo imamas jaunikliui pasiekus 2–3 stadiją, kuri buvo nustatoma remiantis kūno forma, bambagyslės nunykimu stadija ir išsišėrimo laipsniu (Kovacs ir Lavigne, 1986). Jei gimimo data nebuvo žinoma, amžius buvo apskaičiuotas remiantis jauniklio kūno mase (kg) ir amžiaus stadija pagavimo metu (Pomeroy ir kt., 1999), todėl amžius nežymiai variavo įvairių mitybinių stadijų metu. Vidutinė tirtų jauniklių kūno masė tiriamuoju laikotarpiu buvo: S1: 23,62 \pm 3,54 kg, S2: 41,53 \pm 5,62 kg, W1: 41,06 \pm 6,37 kg, W2: 37,02 \pm 5,58 kg.

2.1.2. Mėginių rinkimas ir apdorojimas

Kraujo paėmimas ir apdorojimas. Tiriamosios patelės ir jų jaunikliai gaudyti naudojami tinklus (patelės) arba specialius krepšius (jaunikliai). Suaugusios patelės anestezuotos iš nuotolio paleidžiamomis orinėmis strėlytėmis su automatiniu švirškštu. Strėlytei pataikius į raumenį, anestetikas (Zoletil 100, Virbac, Prancūzija) būdavo automatiškai sušvirškščiama. Po suleidimo patelė buvo paliekama ramybėje maždaug 10 min. iki pradėdavo veikti vaistai. Tuo metu tyrėjai, siekdami sukelti kuo mažesnę stresą, laikydavosi per 20-30 metrų atstumą nuo patelės ir jauniklio. Mėginiai

iš patelės ir jauniklio rinkti paraleliai vienu metu. Jaunikliai būdavo imobilizuojami rankiniu būdu, kraujo ėminių vieta dezinfekuota, suleidžiamas anestetikas ir paimamas kraujas. Visi jauniklių mėginiai ($n = 107$), išskyrus 15 mėginių iš 10 skirtingo amžiaus individų, imti jaunikliams gavus maždaug $0,1 \text{ mg/kg}$ intraveninio anestetiko (Zoletil 100, Virbac, Prancūzija), t. y. saugią dozę šios amžiaus grupės jaunikliams. Anestetikas buvo reikalingas paimti riebalinio audinio, skirto genų ekspresijos vertinimui, mėginį (Bennett ir kt., 2015). Iš neanestezuotų gyvūnų buvo renkami tik kraujo mėginiai. Tiksliai kraujo paėmimo trukmė (įvertinta tik iš 7 2016 m. paimtų mėginių) buvo apie 2 min. (vid. \pm SD – $1,71 \pm 0,49$ min.). Tai taip pat atitiko ankstesnių analogiškų tyrimų laiką, kur kraujas paimtas per mažiau nei 2 min. (Bennett ir kt., 2012). Kraujas buvo renkamas iš ekstraduralinės venos į sterilų 10 ml kalio etilendiaminotetraacto rūgšties (EDTA) vakuteinerį (Becton Dickinson, Oxon, JK). Surinkti kraujo mėginiai kelių valandų bėgyje buvo centrifuguojami 15 min. 2000 g. Atskirta kraujo plazma surinkta naudojant stiklines pastero pipetes ir išskirstyta į $0,5\text{-}1,5 \text{ ml}$ talpos mėgintuvėlius bei nedelsiant užšaldyta ir laikoma $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ (2012 m.) arba $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ (2016 m., 2017 m.) temperatūroje iki ekstrahavimo procedūros bei mėginių analizės.

Seilių surinkimas ir apdorojimas. Seilių mėginiai buvo renkami kiekvieno kraujo mėginio ėmimo metu tik iš anestezuotų gyvūnų, nes seilių mėginių rinkimas be anestezijos iš judrių ir agresyvių jauniklių būtų kėlęs didelį stresą gyvūnui bei sužeidimo riziką tyrėjui. Seilių mėginiai rinkti inertiniais polimeriniais cilindriniais tamponais ($8 \text{ mm} \times 125 \text{ mm}$) (Salimetrics, JK). Tamponas buvo įkišamas į anestezuoto jauniklio burnos šoną ir laikomas iki gyvūnas pradėdavo busti iš miego (ne ilgiau kaip 10 minučių). Taigi seilių mėginių paėmimo trukmė buvo iki 5 kartų ilgesnė ($< 10 \text{ min.}$) nei kraujo paėmimo trukmė ($< 2 \text{ min.}$). Rinkimo metu vienas tampono galas buvo visuomet prilaikomas, gyvūnui leista minimaliai judėti ir tamponą kramtyti. Prieš išimant, tamponėlis buvo naudojamas seilėms surinkti iš burnos kraštų. Tada tamponas būdavo perkeliamas į 5 ml talpos sterilų švirkštą, kuris buvo naudojamas seilėms išspausti iš tampono į 2 ml mėgintuvėlį

(Salicap, IBL International, Vokietija). Surinktas seilių tūris vertintas atsižvelgiant į 0,1 ml tikslumo mėgintuvėlių gradaciją. Prieš kiekvieną seilių ėmimo procedūrą buvo patikrinama burnos sritis ir žiūrima, ar nesimato burnos gleivinės ar tarpdančių pažeidimo ir/ ar kraujavimo. Mėginiai neimti, jei burnos ertmėje ar aplink dantenas buvo matomos kraujo žymės ar švieži kraujuojantys įbrėžimai, o tamponėliai su matomais kraujo pėdsakais utilizuojami. Visos kitos priemonės, kaip žolė ar purvo dalelės, jei tokių buvo, nebuvo plaunamos siekiant išvengti mėginio atskiedimo. Apibendrinus, priežastys, dėl kurių eilių mėginiai lauko darbų metu nebuvo sėkmingai surinkti (traktuota, kaip „nesurinkta“), buvo dvi: a) kraujo pėdsakai arba b) nepakankamas seilių kiekis (taip vadinamas „sausos burnos“ efektas). Po paėmimo kraujo ir seilių mėginiai laikyti aplinkos (kambario) temperatūroje vidutiniškai 2 valandas 9 min. (nuo 25 min. iki 8 val. 49 min.) prieš juos apdorojant, vėliau užšaldyti -20 °C (2012 m.)/ -80 °C (2016 m., 2017 m.) temperatūroje iki mėginių analizės.

2.1.3. Etikos procedūros

Visi mėginiai rinkti kompetentingų ir patyrusių asmenų, turinčių JK vidaus reikalų ministerijos licenciją PPL 60/4009. Šiam darbui taip pat gautas St Andrews universiteto gyvūnų gerovės ir etikos komiteto (AWEC) etikos leidimas. Darbas atliktas laikantis 1986 m. gyvūnų (mokslinių procedūrų) akto (ASPA) ir ES direktyvos dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos (2010 m. /63/ES).

2.1.4. ELISA analizė

2.1.4.1. Kraujo plazmos paruošimas ir steroidinių hormonų ekstrahavimas

ELISA tyrimui plazmos EDTA mėginiai buvo ekstrahuoti remiantis Arbor Assays® (Mičiganas, JAV) skystosios steroidų ekstrakcijos instrukcijomis (Ankarberg-Lindgren ir kt., 2001; Kumar, 2020; Norjavaara ir kt., 1996; Raivio ir kt., 2001). Ekstrakcijos metu 300 µl mėginio sumaišyti su 1,5 ml dietilo eterio (santykiu 1:5), mišinys 10 min. purytas, nucentrifuguotas (10 min. 3000 g) ir užšaldytas -80°C

temperatūroje. Mėginių mišinio skystasis viršutinis sluoksnis buvo nupiltas į individualius 2 ml polipropileno mėgintuvėlius. Siekiant geresnio ekstrakcijos efektyvumo, procedūra kartota tris kartus, o surinktas skystasis organinis sluoksnis išgarintas naudojant vakuuminį Eppendorf koncentratorių 5301 (Hamburgas, Vokietija). Išgarinti mėginiai laikyti -20°C (2012 m.) arba -80°C (2016 m., 2017 m.) temperatūroje iki analizės. Analizės dieną mėginiai atšildyti, ištirpinti 300 µl buferyje (Ibl-International, Hamburgas, Vokietija) ir purtyti 30 min. kambario temperatūroje, siekiant, kad visi sausi komponentai ištirptų ir visiškai susimaišytų su buferiu. Vėliau mišiniai buvo centrifuguojami 10 min. 3000 g ir naudoti ELISA tyrimui.

2.1.4.2. Seilių mėginio paruošimas analizei

Seilių mėginiai buvo kaitinami 1 val. 60°C prieš ELISA pagal gamintojo (Ibl-International, Hamburgas, Vokietija) rekomendacijas, kad būtų denatūruotos bet kokios analizei įtaką galinčios turėti medžiagos (pvz., gleivės ir baltymai, galintys turėti įtakos šviesos sugerčiai ir kt.). Mėginiai buvo palikti atvėsti iki kambario temperatūros ir nucentrifuguoti 3000 g 10 min.

2.1.4.3. Komercinių ELISA rinkinių validavimas ir mėginių analizė

TB analizei buvo naudojami IBL-International (Tecan nuo 2019 m., Hamburgas, Vokietija) ELISA rinkiniai [kat. Nr. RE52151], TS [kat. Nr. RE52631], EB [kat. Nr. RE52041], ES [kat. Nr. RE52601], CB [kat. Nr. RE52061], CS [kat. Nr. RE52611] pagal gamintojo protokolus be jokių pakeitimų. Plokštelių plovimui naudota automatinė EL×50 mikroplokštelių plovimo mašina (Biotek Instruments, Nyderlandai). Šviesos sugertis matuota mikroplokštelių optinio tankio skaitytuvu ELx800™ (BioTek, Nyderlandai) ir analizuota naudojant programą Gen5 ELISA ver. 1.11.5 („BioTek Instruments“, Olandija). Standartinė kreivė buvo nubrėžta naudojant netiesinę 4 parametrų regresiją.

Kiekvienas rinkinys buvo validuojamas pilkųjų ruonių jauniklių seilių ir plazmos tyrimų tinkamumui arba preciziškumui vertinant – vidinį (intra-CV) ir išorinį (inter-CV) variabilumą (variacijos

koeficientą – CV), skiedimo kreivės liniškumą (angl. linearity) ir paralelizmą (angl. parallelism), tikslumą (angl. accuracy) ir koncentracijos išgavimo rodiklį (angl. recovery rate). Tam plazmos ir seilių mėginių mišiniai (angl. pooled samples) buvo atskiesti gamintojo pateiktu nuliniu standartu/ buferiu iki 0,75, 0,5 ir 0,25 neapdorotos koncentracijos. Šis skiedimo diapazonas buvo pasirinktas siekiant užtikrinti, kad matavimai atitiktų standartinės kreivės ribas. Praskiestos gautos koncentracijos buvo palygintos su teorinėmis mėginių mišinių koncentracijomis. Išgavimo rodikliui mėginių mišiniai buvo sumaišyti santykiu 1:1 su a) žemu ir b) aukštu gamintojo pateiktu standartu. Išgavimo rodiklis buvo matuojamas lyginant teorines ir gautas koncentracijas. Visi standartai ir mėginiai buvo analizuojami dviem pakartojimais bet kurioje nurodytoje lėkštelėje.

ELISA validavimas ir plazmos mėginių matavimai buvo atlikti dviejose lėkštelėse, kurios buvo analizuojamos dvejus metus iš eilės 2014 m. (1 lentelė) ir 2015 m. (2 lentelė). Kraujo plazmos inter-CV buvo įvertintas naudojant du mėginius. Visi seilių mėginiai buvo išmatuoti vienoje lėkštelėje tiek 2014 m., tiek 2017 m., todėl inter-CV nebuvo matuotas. Gamintojo nurodytas steroidų jautrumo diapazonas plazmos testosteronui (TB) buvo 0,12–16 ng/ml, seilių testosteronui (TS) – 2–760 pg/ml 2014 m. ir 2–900 pg/ml 2017 m., plazmos estradioliui (EB) – 7 – 1000 pg/ml, seilių estradioliui (ES) – 0,4 – 100 pg/ml, plazmos kortizoliui (CB) – 2,46 – 800 ng/ml, seilių kortizoliui (CS) – 0,015 – 4 µg/dl. Mažiausia gamintojo nurodyta kiekybinio įvertinimo riba (LOQ): ES – 0,4 pg/ml, TS – 2 pg/ml, CS – 0,005 µg/dl, EB – 10,6 pg/ml, TB – 0,07 ng/ml, CB – 2,46 ng/ml. Gamintojo nurodytas kryžminis reaktyvumas su kitomis medžiagomis: ES ir EB – estronas (6,86 %), estriolis (2,27 %); CS ir CB – prednizolonas 30 %, 11-desoksi-kortizolis – 7 %, kortizonas – 4 %; TS - 11β-testosteronas (4,22 %), 11α-testosteronas (3,59%); tuberkuliozei – 11β-testosteronas (8,67%), 11α-testosteronas (3,24%).

Iš viso ištirtas 121 kraujo plazmos mėginys (2012 m. n = 60, 2016 m. n = 30, 2017 m. n = 31) (11 lentelė). Steroidų, ypač EB ir TB, koncentracijos skirtingose lėkštelėse labai skyrėsi; 2014 ir 2015 m.

lėkštelėse nebuvo mėginių, žemesnių už aptikimo ribą (< LOD), tačiau 2016 m. tokių mėginių buvo daugiau (3 lentelė) [dauguma TB (n = 24)] ir nuo 2017 m. (4 lentelė) (EB (n = 1) ir TB (n = 13)) ir jie buvo pašalinti iš bet kurios analizės. Taip pat buvo koncentracijų, kurios buvo mažesnės už kiekybinio nustatymo ribą, pateiktą gamintojų protokoluose (LOQ) 2 lėkštelėje (TB = 12), 3 lėkštelėje (EB = 5, TB = 3 iš 6 likusių mėginių) ir 4 lėkštelėje (EB = 22, TB = 15). Taigi į šį tyrimą buvo įtrauktos koncentracijos, kurios pagal šviesos sugerties analizės programą buvo didesnės už LOD, nors ir mažesnės už gamintojo nurodytas vertes. Mėginiai, kurių koncentracija buvo mažesnė nei LOQ ir mažesnė nei LOD, yra paminėti Priedų S1 lentelėje (< LOD).

Tyrimo metu surinkti skirtingų tūrių seilių mėginiai. Surinkus mažesnę nei 100 µl seilių kiekį buvo įmanoma iširti vieną iš trijų hormonų, ir pirmenybė buvo teikiama kortizolio tyrimui mažesnio mėginio kiekiu, reikalingo kortizolio analizei (2 × 25 µl) lyginant su estradiolio (2 × 50 µl) bei dėl pilotinių tyrimų metu gautais patikimais rezultatais. Kai surinktas seilių kiekis leido analizuoti du steroidus, antru variantu pasirinktas testosteronas, kurio, kaip ir kortizolio, analizei reikėjo mažesnio seilių kiekio (2 × 25 µl). Dėl to galutinis iširtų seilių steroidų mėginių skaičius skiriasi. Daugiausia mėginių iširta CS (2012: n = 37, 2017: n = 23) ir TS (2012: n = 32, 2017: n = 24), mažiausiai ES (2012: n = 31, 2017: n = 22).

2.1.5. Plazmos estradiolio ir testosterono analizė naudojant RIA

17β-estradiolio (EB_RIA) ir testosterono (TB_RIA) radioimuninė analizė (RIA) buvo atlikta Biologijos katedroje, NTNU (Norvegijos mokslo ir technologijos universitetas, Trondheimas, Norvegija) naudojant komercinius radioimuninio tyrimo rinkinius (MP Biomedicals, Kalifornija, JAV) vadovaujantis gamintojo protokolais (ImmuChem Testosterone DA, 07814891.2, Q15-042, A15-065 ir Immu/Chem 17βEstradiol CT, 07815381.6, Q16-031, A16-003 (2/17)). Vidutinis EB_RIA ir TB_RIA variacijos koeficientas, gautas iš trijų

kiekvieno mėginio pakartojimų, buvo < 8,5 % ir 12,6 %. Aptikimų ribos (LOD) buvo nustatytos pagal nurodytas rinkinio protokoluose – 22,8 pg/mL EB_RIA ir 0,1 ng/mL TB_RIA. Gamintojo nurodytas kryžminis reaktyvumas EB_RIA nustatytas su estronu (6,2 %), estrioliu (1,45 %) ir kitomis medžiagomis < 0,01 %, o TB_RIA su 5 α -dihidrotosteronu (3,4 %), 5 α -Androstanas-3 β , 17 β -diolis (2,2 %), 11-oksotestosteronas (2 %) ir kiti < 1 %.

Iš viso RIA metodu buvo ištirtas 31 pilkųjų ruonių jaunikių mėginys. EB_RIA metodu S1 stadijoje sėkmingai nustatytos 8 (F = 4, M = 4) mėginių koncentracijos, S2 – 7 (F = 2, M = 5), W1 – 9 (F = 3, M = 6) ir W2 – 7 (F = 3, M = 4). TB_RIA koncentracijos S1 stadijoje sėkmingai nustatytos 3 (F < LOD, M = 3) mėginiais, S2 – 1 (F = 1, M < LOD), W1 – 2 (F = 2, M < LOD). TB_RIA visos W2 rinktos koncentracijos buvo mažesnės už aptikimo ribą. Taigi visos EB_RIA koncentracijos viršijo aptikimo ribą (LOD), tuo tarpu virš LOD gauti tik 6 TB_RIA mėginiai.

2.1.6. UPC₂-MS/MS analizė

Ultrapajėgios konverguotos chromatografijos ir tandeminės masių spektrometrijos (UPC₂-MS/MS) metodu ištirtas 31 pilkųjų ruonių jaunikių mėginys (4 lentelė). Tyrimas atliktas Norvegijos mokslo ir technologijos universiteto Chemijos katedroje (Trondheimas, Norvegija). Šiuo metodu nustatyti 15 iš 19 analizuotų steroidų koncentracijas (4 lentelė). Instrumentinis mažiausias aptikimo kiekis (LOQ) buvo nustatytas vertinant mažiausią tiesinėje kalibravimo kreivės diapazone gautą koncentraciją, o LOD atitiko LOQ/3. Šis analizės metodas leido nustatyti visų mėginių vertes tik 3 steroidams – COR, CORNE ir COS. Visų kitų steroidų dalies mėginių koncentracijos buvo mažesnės nei LOQ. Statistiniais tikslais nusprendėme naudoti realiais < LOQ koncentracijas 11-deoxyCOR ir DOC steroidams, nes jos buvo artimos > LOQ koncentracijoms ir suteikė geresnę bendrą duomenų pasiskirstymą (Keizer ir kt., 2015). Kadangi likusių steroidų < LOQ koncentracija po kalibravimo turėjo neigiamas vertes, statistinei analizei buvo naudojamos jų LOQ/2 reikšmės (4 lentelė).

4 lentelė. Išanalizuotų mėginių skaičius (N) ir mėginių skaičius <LOQ skirtingiems steroidams kiekvienam mitybos etapui.

	S1	S2	W1	W2	LOQ	LOQ/2
Imties dydis (N):	9	7	9	6	ng/ml	ng/ml
Mėginių sk. < LOQ:						
Kortizolis (COR)	-	-	-	-	0,33	N/A
Kortizonas (CORNE)	-	-	-	-	0,33	N/A
Kortikosteronas (COS)	-	-	-	-	0,33	N/A
11-deoksikortizolis (11-deoxyCOR)	4	-	1	3	0,66	N/A
11-deoksikortikosteronas (DOC)	3	4	6	5	0,33	N/A
Pregnenolonas (PREG)	4	2	6	1	3,33	1,67
Progesteronas (P4)	1	1	5	2	0,33	0,17
Androstenedionas (AN)	6	6	7	4	0,33	0,17
Androstenediolis (A5)	4	2	6	2	3,33	1,67
Testosteronas (T)	9	1	4	-	0,33	0,17
11-ketotestosteronas (KetoTS)	8	5	9	4	0,33	0,17
5 α -dihidrotestosteronas (DHT)	1	1	5	2	0,33	0,17
Dihidroepiandrosteronas (DHEA)	7	4	7	5	3,33	1,67
17 α -hidroksiprogesteronas (17 α -OHP)	4	3	7	4	0,33	0,17
Estronas (E1)	3	2	4	5	1,67	0,83
17 β -estradiol (E2)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
17 α -estradiol (17 α -E2)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
17 α -hydroxypregnenolone (17 α -PREG)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Aldosterone (ALDO)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

2.1.7. Elgsenos tyrimo objektas ir metodai pilkųjų ruonių žindymo ir badavimo laikotarpiams

2.1.7.1. Tyrimo vieta

Isle of May saloje (56°11'Š, 02°33'W) atsivestų pilkųjų ruonių jauniklių elgsena buvo stebima 2017 m. veisimosi sezono metu

(spalio-gruodžio mėn.). Stebėjimui pasirinkta konkreti salos vieta – Tarbet Hole, kur veisimosi sezono viduryje vienu metu galima stebėti apie šimtą patelių ir jų jauniklių. Teritorijoje taip pat skirtingu metu ilsisi 3-7 dominuojantys patinai, saugantys apie 7-12 patelių grupes su jaunikliais. Iš vienos pusės gulykla yra apsupta aukšto skardžio ir yra izoliuota nuo kitų pilkųjų ruonių gulyklų, taip apribojant individų migraciją. Aukštesnis stebėjimo taškas nuo skardžio leidžia vienu metu stebėti kelias dešimtis patelių ir jauniklių porų jų netrikdant (6 pav.). Šio tyrimo rezultatuose pateikti tiek žindymo, tiek badavimo laikotarpiu stebėtų 5 individų, iš kurių rinkti ir kraujo mėginiai, leidžiantys susieti steroidinių hormonų koncentracijas ir elgseną, duomenys.

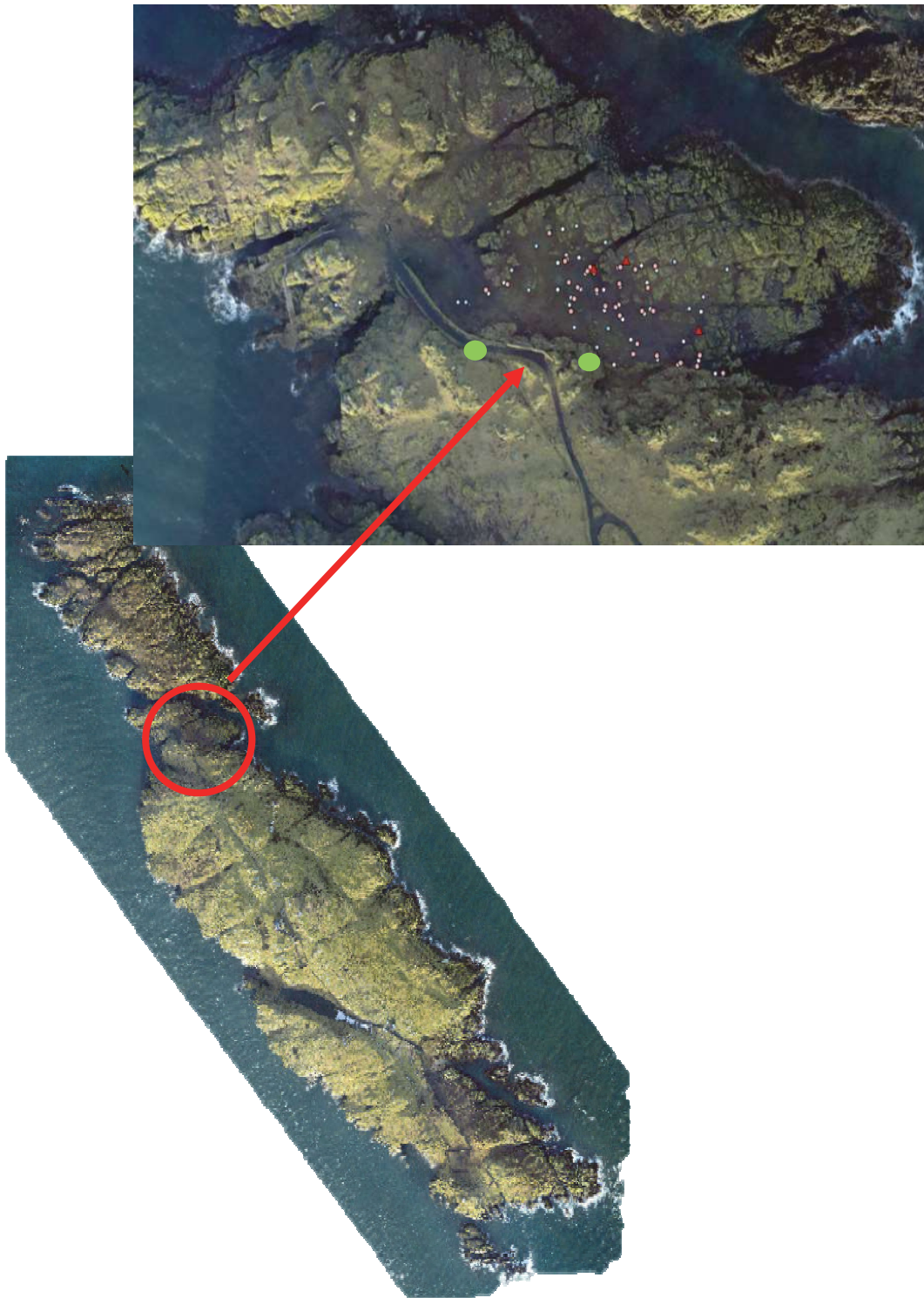
2.1.7.2. Stebėjimo metodika

Žindymo laikotarpis. Elgsena buvo registruojama šviesiu paros metu nuo 8 iki 18 val. iš vieno stebėjimo taško jaunikliai buvo stebimi vidutiniškai 2 valandas per dieną. Elgsenos registravimas prasidėdavo stebėtojų atvykus į stebėjimo vietą. Elgsenos registracijai pasirinktas *skanavimo metodas* (Altmann, 1974), kurio metu jauniklių elgsenos elementai (žr. etogramą, 5 lentelė) pakartotinai registruoti kas 5 min. Vienu metu buvo stebima iki 11 jauniklių ir stebėjimų metu fiksuota: 1) paros laikas, 2) jauniklio ID, 3) elgsenos elementai, 4) kiti individai, jų amžius/ lytis/ ID (jei įmanoma), dalyvaujantys sąveikoje, jei jauniklio elgsena buvo socialinio pobūdžio.

Iš vienos stebėjimo vietos buvo matyti tik pusė stebėjimo kolonijos, todėl stebėjimo laikas buvo dalinamas tarp dviejų stebėjimo vietų (6 pav.). Kol elgsena buvo registruojama vietoje, kitoje ji buvo fiksuojama aukštos raiškos vaizdo kamera (Panasonic HDC-TM60 HD 1920 × 1080). Vėliau įrašai buvo analizuojami naudojant Solomon Coder (Versija: beta 17.03.22, Andrés Péter, 2017) elgsenos analizės programą. Žindomų jauniklių tapatybė buvo nustatoma remiantis motinos tapatybe ir individualiais išoriniais identifikaciniais ženklais. Nors žindymo laikotarpiu, ypač pradžioje, patelės retai atsitraukia nuo jauniklių, patelėms nutolus baltus jauniklius tapdavo sunku atskirti

vieną nuo kito. Siekiant padidinti atpažinimo tikslumą, tiriamieji jaunikliai buvo pažymėti priklijuojamais 5 cm skersmens skirtingos formos juodo audinio lopinėliais. Nusišėrusius jauniklius (4 stadija pagal Kovacs ir Lavigne (1986)) tapdavo įmanoma atpažinti pagal individualų kailio raštą.

Badavimo laikotarpis. Atjunktų jauniklių elgsenos duomenys rinkti šviesiu paros metu nuo 9 iki 17 val. lapkričio 14 – gruodžio 9 dienomis naudojant tą pačią didelės raiškos vaizdo kamerą (Panasonic HDC-TM60 HD 1920 × 1080), kaip ir žindymo laikotarpiu. Tiriamųjų jauniklių vieta buvo pasirinkta *ad libitum*, atsižvelgiant į gyvūno ID ir tiriamųjų individų skaičių stebimoje grupėje. Dėmesys buvo skiriamas daugiau nei vieno jauniklio grupėms, siekiant ištirti socialinės elgsenos dažnį badavimo periodu. Kamera būdavo pastatoma taip, kad netrikdytų individų ir pakankamai saugiai, kad gyvūnas negalėtų jos pasiekti. Filmuojama buvo iki 6 val. per dieną. Siekiant palengvinti tiriamo gyvūno identifikaciją ir buvimo vietos nustatymą, tiriamieji jaunikliai buvo pažymėti nusiplaunančiais rodamino dažais. Elgsenai analizuoti naudojant Solomon Coder (Versija: beta 17.03.22, Andrés Péter, 2017) elgsenos analizės programą ir taikant focal sampling metodą, kurio metu registruota visa tiriamojo jauniklio elgsena (5 lentelė). Šio konkretaus tyrimo metu badaujant po nujunkymo į analizę buvo įtraukti 5 jauniklių (2 patelių ir 3 patinų) vaizdinės medžiagos rezultatai. Asmenys buvo stebimi 31 ± 4 (vidurkis \pm SD) dienų amžiaus $0,96 \pm 0,12$ (vidurkis \pm SD) valandų per dieną, viso $5,05 \pm 1,14$ (vidurkis \pm SD) valandų vienam individui.



6 pav. Didelės skiriamosios gebos Isle of May salos (apačioje) ir Tarbet hole (viršuje) vaizdas su pažymėtomis patelių (rožiniai apskritimai), jauniklių (balti apskritimai) ir suaugusių patinų (raudoni trikampiai) buvimo vietomis. Žali apskritimai rodo taškus, iš kurių vykdyti stebėjimai.

5 lentelė. Pilkųjų ruonių žindančių jauniklių elgsenos etograma. Elgsenos elementai priskirti žindymo, badavimo ar abiem laikotarpiams.

Laikotarpis/-iai	Trumpinys	Trumpas aprašas	Ilgas aprašas
Žindymas	MP	<i>Motinos ir jauniklio sąveika</i>	Fizinis kontaktas tarp jauniklio ir jo motinos.
Žindymas	Skl	<i>Žindymas</i>	Žindymas.
Abu	Loc	<i>Judėjimas</i>	Judėjimas bet kuria kryptimi.
Abu	A	<i>Budrumas</i>	Budrumo būseną, kai jauniklio kūnas įsitempęs, kaklas ištiestas, galva pakelta, tikrinama aplinka.
Abu	SI - D	<i>Socialinis tyrinėjimas per atstumą</i>	Tiriamasis individas šiek tiek nuleidęs galvą įdėmiai žiūri į kitą, uodžia kitą individą iš tolo. Kontaktas tarp individų nevyksta.
Badavimas	SI - C	<i>Socialinis tyrinėjimas per kontaktą</i>	Vienas individas uodžia kitą arba rodo kitus susidomėjimo požymius, liečia vibrises, plaukmenis, snukį savo snukiu ar dantimis. Matomas fizinis kontaktas tarp individų. Glaudus kontaktas tarp motinos ir jauniklio žymimas MP.
Abu	NI	<i>Nesocialinis tyrinėjimas</i>	Aplinkos, t. y. negyvų aplinkos objektų ar kitos rūšies atstovų tyrinėjimas vibrisėmis, snukiu, burna ar priekiniais plaukmenimis.
Abu	SP	<i>Socialinis žaidimas</i>	Bet koks socialinis žaidimas tarp jauniklių (žindomų ir atjunkytų), įskaitant žaidimo kovą ir poravimosi imitavimą.
Abu	NP	<i>Nesocialinis žaidimas</i>	Nesocialus žaidimas, nukreiptas į negyvus objektus (akmenis, žolę ir kt.), išreikštas jų griebimu, traukimu ir mėtymu; taip pat apibrėžiamas specifiniais žaidimui pasikartojančiais, perdėtais, staigiais jauniklio kūno judesiais.
Abu	Ag	<i>Agonistinė elgsena</i>	Bet koks agonistinis elgesys, nukreiptas į kitą individą.
Abu	R	<i>Poilsis</i>	Miegas.
Abu	Voc	<i>Vokalizacija</i>	Jauniklis skleidžia garsą.

2.1.8. Statistinė analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Statistiniai skirtumai laikomi reikšmingais, kai $p < 0,05$. Išsamesnė informacija apie statistinę analizę pateikiama toliau pateiktuose skyriuose.

ELISA validavimas. Plazmos plokštelių *preciziškumas* (t.y. kaip to paties mėginio vertės atsikartoja tarp matavimų) vertintas naudojant vidinį ir išorinį variacijos koeficientą. Išorinis (*inter-CV*) gautas naudojant du 2012 m. mėginius, kiekvienas išmatuotas dviem egzemplioriais kiekvienoje iš dviejų plokštelių. Vidutinis vidinis variacijos koeficientas (*intra-CV*) kiekvienai lėkštelei gautas apskaičiavus kiekvieno mėginio dviejų pakartojimų toje pačioje lėkštelėje vidurkį, standartinį nuokrypį bei išvedus jų variacijos koeficientą (CV) ir išvedus visų mėginių CV vidurkį. Intra- ir inter-CV tikslumas buvo laikomas priimtinu, kai $< 20\%$.

Paraleliškumas buvo nustatytas vizualiai įvertinus grafikus, kuriuose buvo pavaizduotas standartinės kreivės bei seilių ar plazmos mišinių optinis tankis esant tam tikram praskiedimui. Plazmos ir seilių rinkinių *tikslumas* (t. y. kiek gautos vertės atitinka teorines arba priimtinias) buvo nustatytas atliekant dviejų plokštelių praskiestų plazmos ar seilių mišinių (plazma: $n = 6$; seilės: CS, TS $n = 6$, ES = 5) gautos ir teorines koncentracijų) tiesinės regresijos analizę, kuri turėtų rodyti reikšmingą teigiamą ryšį su vienetui artimu nuolydžiu (nuolydis laikytas priimtinu kai $0,8-1,2$, o $r^2 > 0,95$) (Hunt ir kt., 2017; Kershaw ir Hall, 2016). Išgavimo rodikliui gautos ir teorinės koncentracijos didelės ir mažos seilių ir plazmos mėginiuose buvo palygintos naudojant suporuotą t testą. Skiedimo vertės buvo laikomos priimtinomis, jei jos neviršijo 30% gautos koncentracijos esant mažoms koncentracijų vertėms, o mėginių išgavimo rodiklis, jei jos neviršijo 20% teorinės vertės (Yan, 2018).

Steroidų koncentracijų seilėse ir plazmoje palyginimas. Ryšiui tarp kortizolio koncentracijos seilėse ir plazmoje nustatyti buvo naudojama tiesinė regresinė analizė. Estradiolio ir testosterono koncentracijai

seilėse ir plazmoje palyginti buvo naudojama neparametrinė Spearman rango koreliacija. Rezultatai pateikti kaip bendras arba dalinis ryšys tarp seilių ir skirtingų ELISA plokštelių analizei (1 lėkštelė (surinkta 2012 m., analizuota 2014 m.), 2 lėkštelė (surinkta 2012 m., analizuota 2015 m.), 4 lėkštelė (surinkta 2017 m. 2018 m.)).

Seilių steroidų koncentracijos priklausomybė nuo mėginio tūrio. ELISA gamintojas rekomenduoja analizei naudoti > 0,5 ml tūrio seilių mėginius. Tačiau laukinėje gamtoje ne visada buvo gautas reikiamas seilių mėginio tūris, todėl buvo naudojama Spearman rango koreliacija, siekiant įvertinti, ar gautas seilių mėginio tūris buvo susijęs su steroidų (ES, TS, CS) koncentracija. Rezultatai buvo pateikti kaip bendra ir dalinė koreliacija tarp seilių surinkimo metų (2012 ir 2017).

Dviejų matricių jautrumo palyginimas. Apibendrintas linijinis mišrus modelis (GLMM) buvo naudojamas norint įvertinti galimą mitybinės stadijos (S1, S2, W1, W2), maitinimosi periodo (žindymo ir po nujunkymo), jauniklių lyties, kūno masės (kg), amžiaus (dienos) ir paros laiko poveikį EB ir ES mėginių koncentracijoms (n = 27), bei papildomai – plazmos lėkštelės numerio (1 lentelė, 2 lentelė, 3 lentelė) CB ir mėginių ėmimo metų (2012, 2017) poveikį CS palyginamiems mėginiams (N = 55). ES ir EB palyginamajai analizei buvo naudojami tik 2012 m. mėginiai, nes tarp 2017 m. rinktų mėginių skirtingų matricių koreliacijos nebuvo. EB naudotas normalaus pasiskirstymo modelis su tiesinio ryšio funkcija, o CB, CS ir ES – gama pasiskirstymo modelis su log ryšio funkcija. Koreguotas Akaike informacijos kriterijus (AICc) buvo naudojami renkant geriausią modelį su reikšmingais faktoriais.

ELISA verčių palyginimas su steroidų vertėmis, gautomis alternatyviais analizės metodais. Skirtingų plazmos estradiolio (EB_RIA vs. EB) ir kortizolio (CB vs. COR) koncentracijų gautų skirtingais metodais palyginimui buvo naudojamas ICC dvipusis mišrus modelis. Naudotas lyginamasis tipas (angl. *Consistency*), o ne absoliutaus sutapimo (angl. *Absolute agreement*), nes absoliučios koncentracijos skirtinguose metoduose skyrėsi. Cronbacho alfa buvo naudojamas vidiniam ICC nuoseklumui („patikimumui“) matuoti. Koncentracijos tarp dviejų metodų buvo palygintos naudojant suporuoto mėginio

T testą (t). Testosteronas nebuvo įtrauktas į analizę dėl didelio koncentracijų, mažesnių už aptikimo ribą (< LOD), skaičiaus taikant abu metodus – ELISA (TB) ir RIA (TB_RIA).

Elgsenos analizė. Friedmano 2 krypčių ANOVA (χ^2) su Dunn's testu buvo naudojama siekiant nustatyti reikšmingus skirtumus tarp skirtingos elgsenos dalies (%) vidurkių atskirai žindymo (n = 5) ir atjunkymo (n = 5) laikotarpiais. Remiantis surinktais duomenimis, buvo stengiamasi rasti sąsajas tarp pilkųjų ruonių jauniklių elgsenos proporcijos ir steroidų koncentracijos naudojant paprastą Spearman rango koreliaciją. Į palyginimą taip pat buvo įtraukta vidutinė kūno masė (kg) ir vidutinis amžius (dienomis). Naudotos steroidų koncentracijos buvo gautos taikant RIA (EB_RIA), UPC₂-MS/MS (DHEA, AN, A5, TS, DHT, KetoTS, DOC, 11-deoksiCOR, ALDO, COS, CORNE, PREG, P4, 17 α -OHP, E1). CS, CB ir COR nebuvo įtraukti į analizę, nes kortizolis buvo jautrus mėginių ėmimo trukmei, TB ir TB_RIA buvo neįtraukti dėl mažo mėginio dydžio, viršijančio LOQ / LOD, ES nebuvo įtrauktas, nes koncentracijos gautos tik 3 individams žindymo laikotarpiu. Koreliacijos koeficientas ir reikšmingumo lygis (p) buvo lyginami siekiant įvertinti reikšmingas koreliacijas vidutinei atskiro ruonio elgsenos elementų daliai (%) su kūno mase, amžiumi ir vidutine skirtingų steroidų koncentracija žindant (n = 5) ir po atjunkymo (n = 5).

2.2. REZULTATAI

2.2.1. Seilių ir kraujo mėginių surinkimo sėkmingumo palyginimas

Iš visų surinktų 102 plazmos mėginių (2012 m. – 71, 2017 m. – 31), kai buvo bandyta paraleliai imti seiles (2016 metais seilės nebuvo renkamos), ELISA optimizavimui panaudota 11 mėginių. Taigi 91 (2012 m. – 60, 2017 m. – 31) plazmos mėginys buvo naudojamas ELISA validavimui ir tolesnei statistinei analizei. Sėkmingai surinkti 62 mėginiai (2012 m. – 38, 2017 m. – 24) arba 60,19 % (2012 m. – 54 %, 2017 m. – 77 %) visų 102 mėginių ėmimo atvejų. Nesėkmingi seilių mėginių ėmimo atvejai (n = 40) atsirado dėl per mažo surinkto

seilių kiekio tiriamųjų individų anestezijos metu arba dėl mėginių užterštumo krauju. Iš surinktų seilių mėginių 9 (14,52 %) buvo daliniai mėginiai (šeši mėginiai, kai ištirti užteko du steroidus ir keturi mėginiai, kai buvo tiriamas tik vienas steroidas) ir 53 (84,48 %) pilni seilių mėginiai. Apibendrinus, pakankamai seilių trijų steroidų analizei surinkta ~ 52 % visų gyvūnų kraujo ėmimo atveju. Taip pat 2012 metų trys TS mėginiai (du iš S1 mitybos etapo ir vienas iš S2) viršijo aptikimo ribą, o mėginio ar reagento nepakako analizės pakartojimui, tad šie mėginiai nebuvo įtraukti į tolimesnę statistinę analizę.

2.2.2. ELISA rinkinių validavimas kraujo plazmos ir seilių steroidų tyrimams

Kraujo plazmos (EDTA) steroidų tyrimo validavimas. Analizės metu sėkmingai validuotas ELISA lėkštelių estradioliui ir kortizoliui panaudojimas. Intra-CV tyrimo metu buvo < 15 %, o sukeltinių mėginių realios koncentracijos skyrėsi mažiau nei 20 % nuo teorinių. Realios ir teorinės sukeltinės abiejų steroidų koncentracijos reikšmingai nesiskyrė (CB (n = 4): t = 0,24, df = 3, p = 0,83, EB (n = 6): t = -0,24, df = 5, p = 0,82). Skiedimo kreivės buvo lygiagrečios standartiniams CB ir EB kreivėms. Realios ir teorinės atskiestų mėginių koncentracijos parodė tiesinį ryšį su 1 artimu nuolydžiu tiek kortizoliui ($r^2 = 0,95$, df = 5, p < 0,01, nuolydis – 0,95), tiek estradioliui ($r^2 = 0,97$, df = 5, p < 0,001, nuolydis – 0,92). Inter-CV buvo 8 % EB ir 25 % CB.

TB intra-CV buvo < 11 % (išskyrus aukštą 23 % intra-CV 4 lėkštelėje, kurią galėjo nulemti labai žemos mėginių koncentracijos), o vidutinis koncentracijų išgavimo rodiklis siekė 106 %. Realios ir teorinės sukeltinės TB koncentracijos reikšmingai nesiskyrė (n = 4, t = -0,642, df = 3, p = 0,57). Skiedimo kreivės buvo lygiagrečios standartinei kreivei, o realios ir teorinės atskiestų mėginių koncentracijos parodė tiesinį ryšį su 1 artimu nuolydžiu 1 ($r^2 = 0,99$, df = 5, p < 0,001, nuolydis – 0,99). Tačiau inter-CV buvo nepriimtina didelis (86 %), todėl šis plazmos testosterono ELISA tyrimas nebuvo sėkmingai validuotas.

Steroidinių hormonų koncentracijos atitiko schemą – CB vid. = 68,53 ng/ml (min-max: 16,56 – 161,25) > TB vid. = 0,39 ng/ml (min-max: 0,01 – 1,12) > EB vid. 375,25 pg/ml (0,64 – 385,9), tačiau absoliučios vidutinės vertės skyrėsi priklausomai nuo analizės metų ir lėkštelės.

Seilių steroidų tyrimo validavimas. Skiedimo kreivės buvo lygiagrečios standartinėms visų steroidų kreivėms seilėse. Visi trys rinkiniai buvo sėkmingai validuoti. Visų steroidų CV buvo < 11 %. Sukeltinių koncentracijų išgavimo rodikliai TS ir CS neviršijo 20 %, o ES – 30 %. Realios ir teorinės sukeltinės koncentracijos nesiskyrė visiems trimis steroidams (CS (n = 4): t = 0,76, df = 3, p = 0,5, ES (n = 4): t = -1,09, df = 3, p = 0,36, TS (n = 4): t = 0,01, df = 3, p = 0,99). Realios ir teorinės atskiestų mėginių koncentracijos parodė tiesinį ryšį su 1 artimu nuolydžiu – seilių kortizoliui ($r^2 = 0,93$, df = 5, p < 0,01, nuolydis – 0,96), estradioliui ($r^2 = 0,88$, df = 4, p = 0,015, nuolydis – 0,94) ir testosterono ($r^2 = 0,98$, df = 5, p < 0,001, nuolydis – 0,99).

Steroidinių hormonų koncentracijos seilėse atitiko koncentracijų dydžio pasiskirstymą kraujyje: CS vid. = 0,17 µg/dl (min-max: 0,05 – 0,479) > TS vid. = 108,76 pg/ml (min-max: 18,75 – 396,88) > ES vid. = 13,56 pg/ml (min-max: 4,34 – 42,45). Visos seilių steroidų koncentracijos skirtingais metais skyrėsi.

2.2.3. Mėginio tūrio, anestezijos ir paros laiko poveikis steroidų koncentracijai seilėse

Nebuvo ryšio tarp paros laiko, kada buvo paimtas mėginys, ir tirtų steroidų koncentracijos (ES: n = 53, TS: n = 56, CS: n = 59, Spearman, p > 0,05). Taip pat nebuvo reikšmingų tirtų steroidų koncentracijų skirtumų tarp anestezuotų ir neanestezuotų jauniklių (ES: n = 4, TS, CS: n = 5, MW, p > 0,05). Seilių mėginio tūris reikšmingai neigiamai koreliavo su ES (n = 53, r = -0,41, p < 0,01) ir TS (n = 56, r = -0,52, p < 0,001) koncentracijomis, bet ne su CS (n = 60, r = -0,02, p = 0,91).

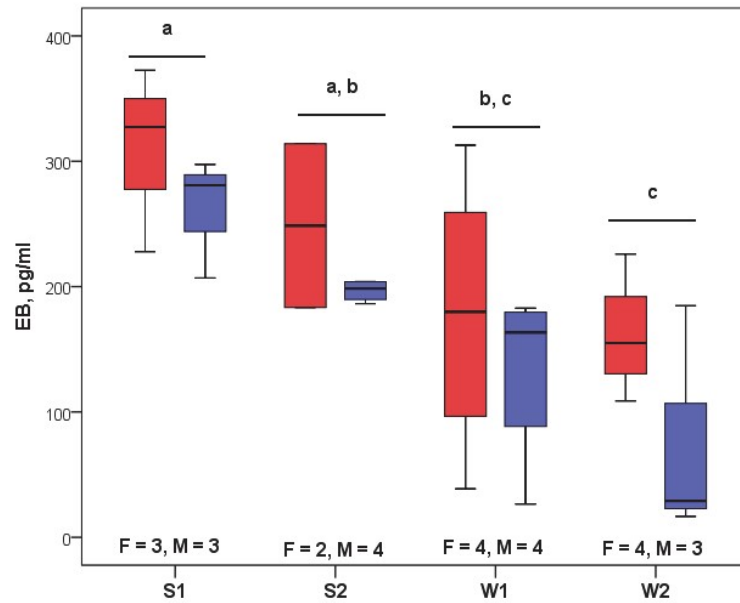
2.2.4. Koreliacijos tarp steroidų koncentracijos seilėse ir plazmoje

Dėl riboto seilių mėginio tūrio buvo galima palyginti ryšį tarp 55 kortizolio, 49 estradiolio ir 44 testosterono mėginių dviejose matricose. Trijų 2014 m. analizės mėginių TS reikšmės viršijo standartinės kreivės ribą (760 pg/ml), o mėginio nepakako pakartotiniam tyrimui praskiedus, todėl į analizę jos nebuvo įtrauktos. Be to, nemaža dalis 2017 m. plazmos mėginių buvo žemiau aptikimo ribos, todėl koreliacijai buvo galima panaudoti tik nedidelį kiekį suderintų mėginių.

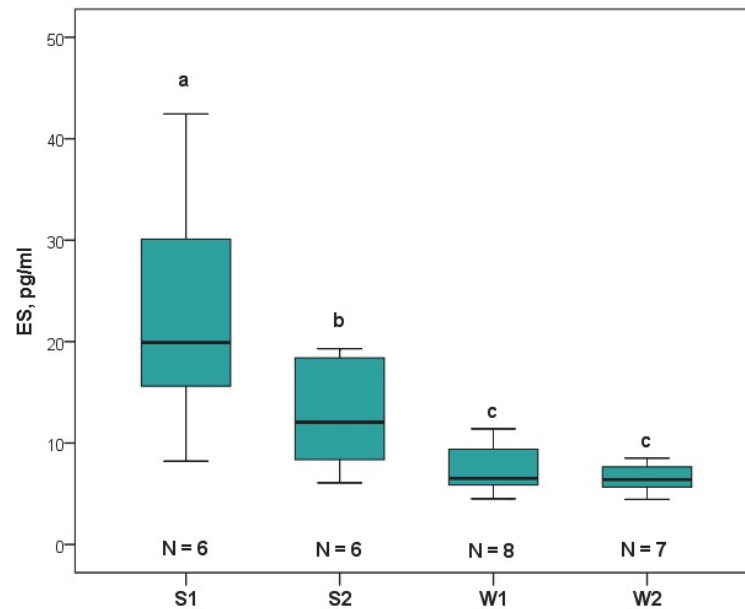
Reikšmingo bendro ryšio tarp ES ir EB koncentracijų nebuvo ($N = 49$, Spearman $R = -0,09$, $p = 0,54$). Tačiau koreliacijos stiprumas ir reikšmingumas skyrėsi tarp lėkštelių: koncentracijos 1 lėkštelėje parodė stipresnį ryšį (1 lėkštelė: $N = 20$, $r = 0,61$, $p < 0,01$), bet jokio ryšio su koncentracija plazmoje, kuri buvo gerokai mažesnė, likusiose lėkštelėse nepastebėta. Buvo geras reikšmingas bendras ryšys tarp CB ir CS ($N = 55$, $r = 0,63$, $r_{adj}^2 = 0,4$, $F_{1,53} = 34,66$, $p < 0,001$). TB ir TS neparodė bendros koreliacijos ($N = 44$, Spearman $r = 0,12$, $p = 0,44$), taip pat nebuvo pastebėta reikšmingų koreliacijų atskirose lėkštelėse.

2.2.5. Lyties ir mitybinės stadijos poveikis steroidų koncentracijoms plazmoje ir kraulyje

Geriausias modelis, aprašantis EB koncentracijų pokyčius, apėmė du reikšmingus kintamuosius ($AICc = 260,61$ vs. $AICc_0 = 314,83$). EB koncentracija reikšmingai skyrėsi tarp mitybinių jauniklio stadijų ($F_{3,22} = 7,18$, $p < 0,01$) ir moteriškos lyties jauniklių buvo reikšmingai didesnis ($F_{1,22} = 4,42$, $p = 0,047$). EB buvo didžiausias ankstyvuojų žindymo laikotarpiu, išliko žemesnis ir stabilus vėlyvojo žindymo ir ankstyvojo badavimo laikotarpiais ir vėl sumažėjo vėlyvuojų badavimo periodu (7a pav.). Mitybos stadija buvo vienintelis reikšmingas ES koncentracijų pokyčius aprašantis faktorius ($AICc = 30,64$ vs. $AICc_0 = 56,23$; $F_{3,23} = 14,44$, $p < 0,001$). Didesnės ES koncentracijos buvo ankstyvo ir vėlyvojo žindymo metu (7b pav.).

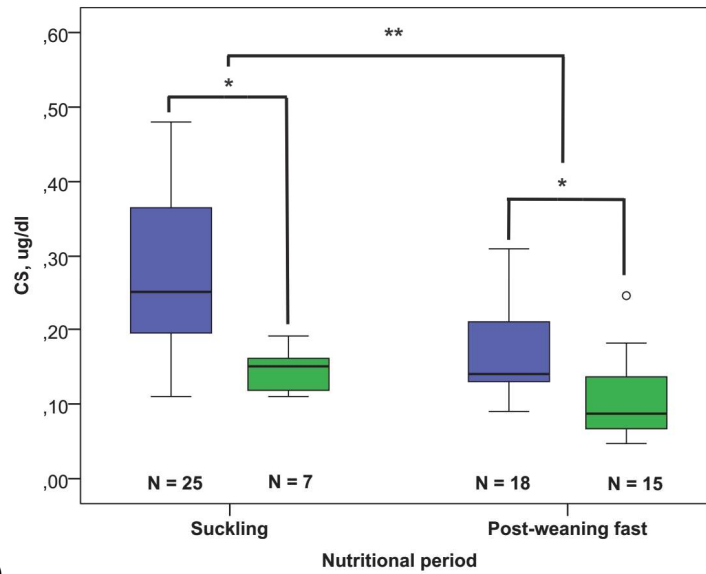


(a)

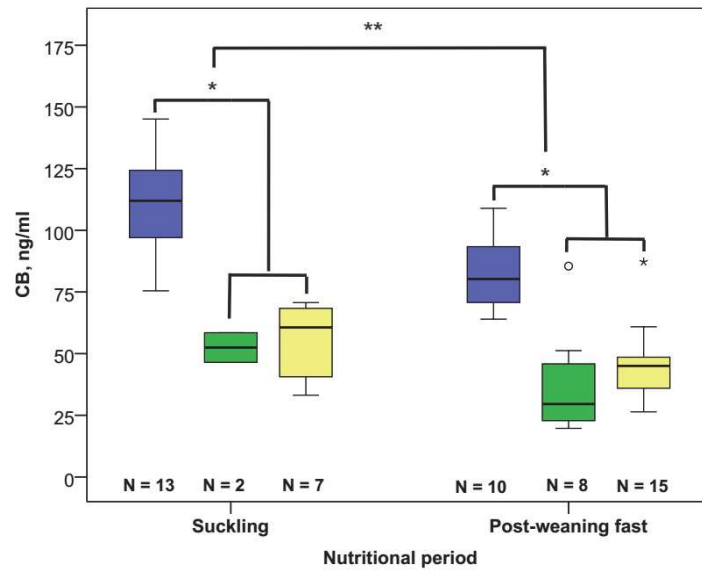


(b)

7 pav. Pilkųjų ruonių jauniklių EB (a) ir ES (b) koncentracijos skirtingomis mitybinėmis stadijomis (S1, S2, W1, W2). Raudonos dėžutės žymi pilkųjų ruonių moteriškos, mėlynos – vyriškos lyties jauniklių EB koncentraciją. Skirtingos rodo reikšmingus ($p < 0,05$) skirtumus tarp steroidų koncentracijos skirtingomis mitybinėmis sąlygomis. Vidurinė linija žymi medianą, išorinė dėžutė – tarpkvartilinį atstumą; ūsai – 95 % pasikliautinuosius intervalus. Imties dydis (N) kiekvienam mitybos etapui nurodytas grafiko apačioje.



(a)



(b)

8 pav. Pilkujų ruonių jauniklių CB (a) ir CS (b) koncentracijos skirtingais mitybiniais periodais (*suckling* – žindymo, *post-weaning fast* – badavimo). Skirtingos CB dėžučių spalvos žymi skirtingas ELISA lėkšteles (mėlyna – 1 lėkštelė (2014 m.), žalia – 2 lėkštelė (2015 m.), geltona – 4 lėkštelė (2008 m.), o skirtingos CS dėžučių spalvos žymi skirtingą koncentraciją skirtingais mėginių rinkimo metais (mėlyna – 2012, žalia – 2017). * reikšmingi ($p < 0,05$) steroidų koncentracijų skirtumai tarp skirtingų (lėkštelių CB) arba mėginio rinkimo metų (CS); ** reikšmingi steroidų koncentracijų skirtumai ($p < 0,05$) tarp mitybinių periodų. Vidurinė linija žymi medianą, išorinė dėžutė – tarpkvartilinį atstumą, ūsai – 95 % pasikliautinuosius intervalus, apskritimai – išskirtiniai, žvaigždutės – ekstremumai. Imties dydis (N) kiekvienam mitybiniam periodui nurodytas kiekvieno grafiko apačioje.

Geriausias modelis, apibūdinantis CB pokyčius, apėmė du reikšmingus kintamuosius ($AICc = 42,02$ vs. $AICc_0 = 101,04$). CB reikšmingai skyrėsi tarp lėkštelių ($F_{2,51} = 29,05$, $p < 0,001$) ir mitybinio periodo ($F_{1,51} = 8,03$, $p < 0,01$). CB koncentracija buvo didžiausia 1 lėkštelėje (2014 m.), o mažesnė likusiose, tarp kurių reikšmingo skirtumo nerasta (8a pav.). Individo ID kaip atsitiktinis faktorius nepagerino modelio ir buvo pašalintas. Mitybinis periodas (žindymas vs. badavimas, $F_{1,52} = 18,42$, $p < 0,001$) ir metai (2012 m. vs. 2017 m., $F_{1,52} = 14,48$, $p < 0,01$) buvo reikšmingi faktoriai paaiškinantys CS koncentracijos pokyčius ($AICc = 63,64$ vs. $AICc_0 = 89,36$). Didesnės koncentracijos buvo stebimos žindymo laikotarpiu ir 2012 m (8b pav.). Atsitiktinis faktorius, nors ir nereikšmingas, iš esmės pagerino modelį.

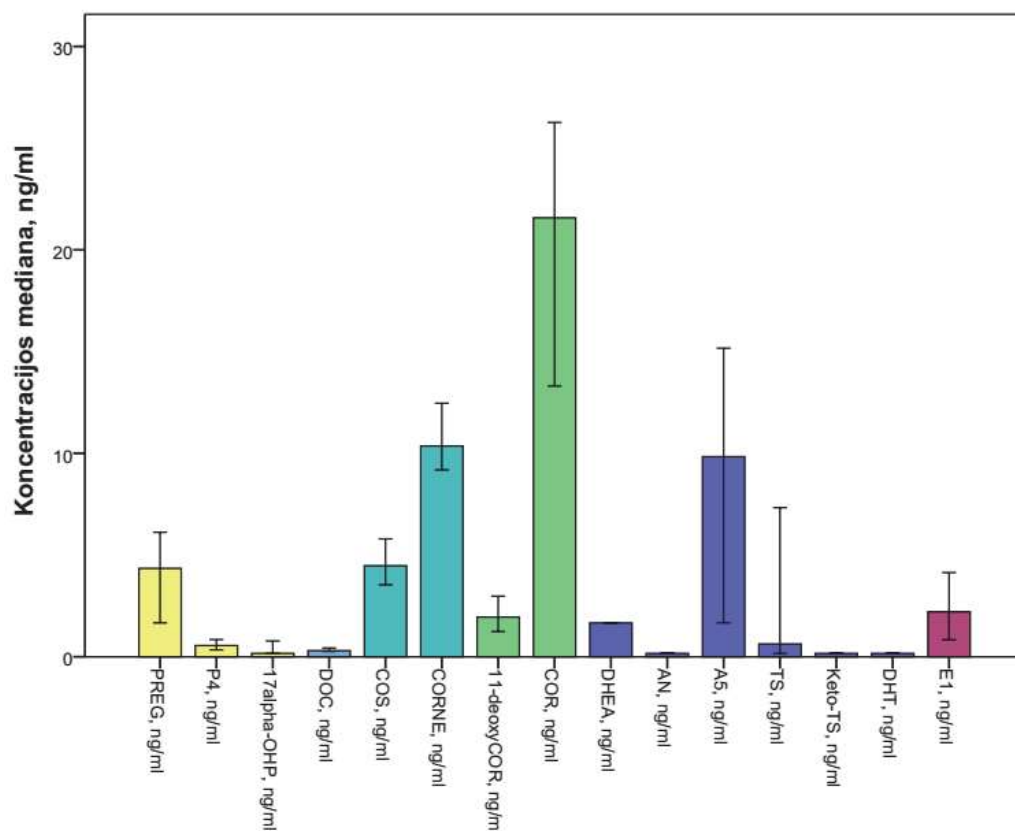
2.2.6. Steroidų koncentracijų, gautų naudojant ELISA ir alternatyvių metodų (RIA, UPC₂-MS/MS) palyginimas

EB koncentracijos mediana 9,06 pg/ml (IQR = 7,28, min = 0,64, max = 40,17) buvo maždaug dešimt kartų mažesnė nei EB_RIA koncentracijos mediana – 21,58 pg/ml (IQR = 14, 43, min = 5,53, max = 54,94) (vidutinis EB_RIA ir EB skirtumas – $116,38 \pm 44,94$ pg/ml, $t = 14,42$, $df = 30$, $p < 0,001$). ICC koeficientas buvo teigiamas reikšmingas tiek individualiems (ICC = 0,26 (95% PI = -0,09 - 0,56)), tiek vidutiniams (ICC = 0,42 (95% PI = -0,21 - 0,72)) matavimams ($F_{30,30} = 1,72$, $p = 0,07$). Kronbacho alfa – 0,42. Rasta gera teigiama koreliacija (N = 31) tarp neapdorotų (EB_RIA) ir ekstrahuotų (EB) mėginių koncentracijų.

CB koncentracijos mediana 46,61 ng/ml (IQR = 26,27, min = 22,21, max = 87,2) buvo maždaug dvigubai didesnė nei COR koncentracijos – 21,58 ng/ml (IQR = 14, 43, min = 5,53, max = 54,94) (vidutinis CB ir COR skirtumas – $27,16 \pm 10,2$ ng/ml, $t = 14,82$, $df = 30$, $p < 0,001$). ICC koeficientas buvo teigiamas reikšmingas tiek atskiriems ICC = 0,73 (95% PI = 0,51 – 0,86), tiek vidutiniams ICC = 0,84 (95% PI = 0,68 - 0,93) matavimui ($F_{30,30} = 6,4$, $p < 0,001$). Kronbacho alfa yra 0,84. Labai gera koreliacija (N = 31) buvo pastebėta tarp neapdorotų (COR) ir ekstrahuotų (CB) mėginių koncentracijų.

2.2.7. Steroidų koncentracijos, išmatuotos UPC₂-MS/MS ir RIA metodu

UPC₂-MS/MS metodu nustatytos 15 steroidų koncentracijų vertės labai skyrėsi tarpusavyje (9 pav.). Didžiausia koncentracija (apie 10-20 ng/ml) buvo rasta tarp gliukokortikoidų ir mineralokortikoidų – kortizolio (COR), kortizono (CORNE), kortikosterono (COS). Jų pirmtakų – 11-deoksikortizolio (11-deoxyCOR) ir deoksikortikosterono (DOC) – kiekis buvo daug mažesnis. Androstenediolis (A5) buvo gausiausias androgenas (~10 ng/ml), tačiau kitų androgenų koncentracija labai maža, dauguma jų < LOQ. Pregnenolonas (PREG) buvo gausiausias progestogenas ir svyravo apie 5 ng/ml. Estronas (E1) buvo vienintelis šiuo metodu aptiktas estrogenas ir jo koncentracija siekė apie 2 ng/ml. koncentracija buvo < LOQ.



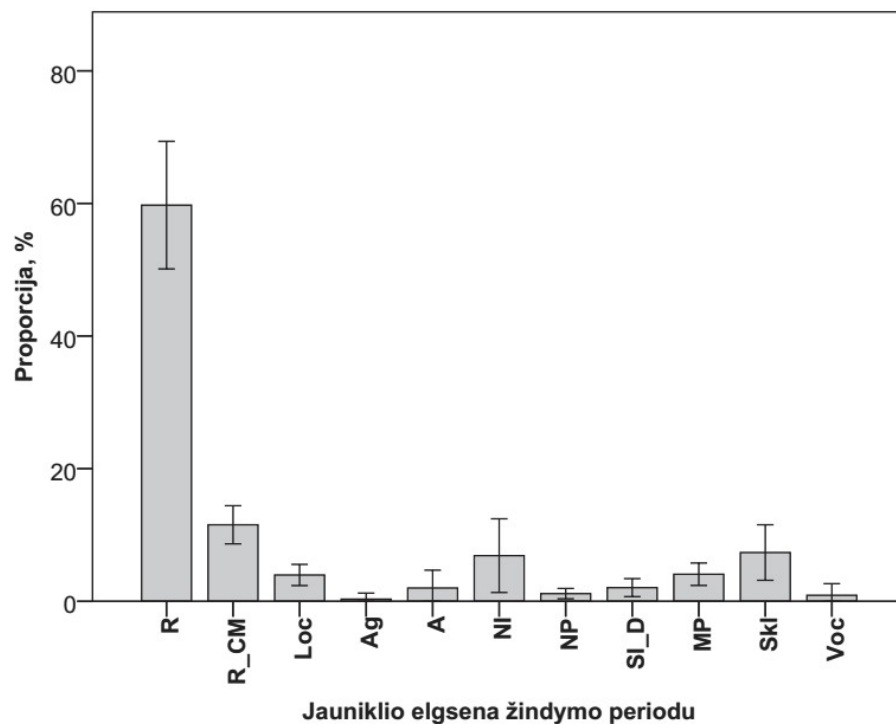
9 pav. Skirtingų steroidų koncentracijų medianos (su 95 % pasikliautiniais intervalais), analizuotos UPC₂-MS/MS. Spalvos atitinka skirtingas steroidų klases: geltona – progestogenai, šviesiai mėlyna – pereinamasis steroidas tarp gliukokortikoidų ir mineralokortikoidų, žalia – gliukokortikoidai, tamsiai mėlyna – androgenai, violetinė – estrogenai. Steroidų trumpiniai paaiškinti 4 lentelėje.

Reikšmingi koncentracijų skirtumai skirtingų mitybinių stadijų (S1, S2, W1, W2) metu nustatyti kortizonui (CORNE, S1: $14,95 \pm 5,76$ ng/ml, S2: $12,49 \pm 1,85$ ng/ml, W1: $9,85 \pm 3,63$ ng/ml, W2: $8,74 \pm 1,82$ ng/ml, KW: $p = 0,02$), 11-deoksikortikosteronui (DOC, S1: $0,48 \pm 0,18$ ng/ml, S2: $0,43 \pm 0,2$ ng/ml, W1: $0,27 \pm 0,13$ ng/ml, W2: $0,26 \pm 0,1$ ng/ml, KW: $p = 0,045$) ir testosteronu (T2, S1: $8,11 \pm 6,6$ ng/ml, S2: $0,17$ (LOQ/2), W1: $6,61 \pm 9,63$ ng/ml, W2: $5,48 \pm 5,46$ ng/ml, KW: $p < 0,01$). Reikšmingai tarp skirtingos lyties jaunikių skyrėsi androstenediono (AN) (patelės: $1,21 \pm 2,47$, patinėliai: $0,18 \pm 0,04$, MW: $p < 0,01$) ir estradiolio, analizuoto radioimunoanalizės metodu (EB_RIA) (patelės: $156,89 \pm 50,96$ ng/ml, patinėliai: $112,35 \pm 45,45$ ng/ml, $p < 0,01$), koncentracijos. Didžioji dalis patelių jaunikių ($n = 11$) androstenediono (AN) mėginių koncentracija buvo didesnė už LOQ, tačiau visų, išskyrus vieną, vyriškos lyties jaunikių mėginių ($N = 20$) šio steroido koncentracija buvo $< LOQ$.

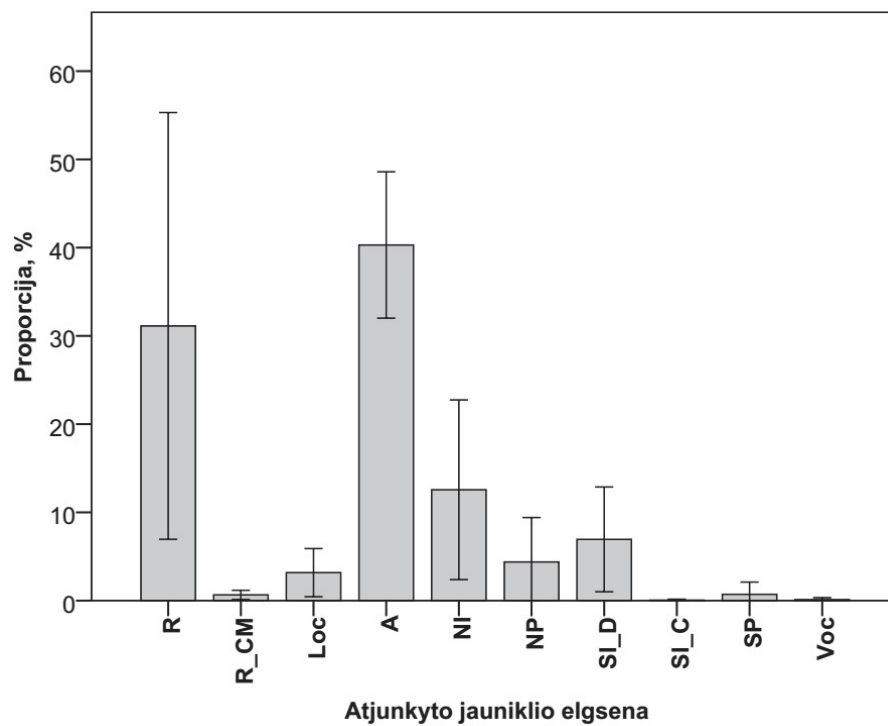
2.2.8. Ankstyvosios pilkųjų ruonių jaunikių elgsenos ir steroidinių hormonų sąveika

Žindymo metu jaunikių elgsenoje dominavo ramybės (R) elgsena, kurią sekė komforto judesiai (R-CM) ir žindymas (SkI). Skirtingų elgsenos elementų dalis bendrame repertuare reikšmingai skyrėsi (Friedmano $\chi^2 = 42,51$, $df = 10$, $p < 0,001$). Po Dunn korekcijos reikšmingi skirtumai rasti tik tarp R, R-CM, SkI lyginant su Ag, Voc ir NP (10a pav.). Reikšmingų elgsenos skirtumų tarp skirtingos lyties individų nerasta nei žindymo, nei badavimo periodais (MW, $p > 0,05$).

Stipri reikšminga teigiama koreliacija nustatyta tarp R ir 11-deoksikortizolio (11-deoksiCOR, $r = 0,9$, $p = 0,037$), o priešinga neigiama koreliacija – su progesteronu (P4, $r = -0,9$, $p = 0,037$). Nustatyta neigiama reikšminga koreliacija tarp pregnenolono (PREG) ir budrumo elgsenos (A, $r = -0,9$, $p = 0,037$), o ir priešinga su kortizonu (CORNE, $r = 0,9$, $p = 0,037$). Kortikosteronas (COS) teigiamai koreliavo tiek su žindymu (SkI), tiek su motinos ir jauniklio sąveika (MP) ($r = 0,9$, $p = 0,037$). Budrumo elgsena taip pat teigiamai ($r = 0,89$, $p = 0,04$), o žindymas neigiamai koreliavo ($r = -0,89$, $p = 0,04$).



(a)



(b)

10 pav. Elgsenos elementų dalis (%) žindymo (a) ($n = 5$) ir atjunktymo (b) ($n = 5$) periodais. Grafike pateiktos medianos su 95 % pasikliauties intervalais. Skirtingos raidės identifikuoja reikšmingus skirtumus tarp grupių (Dunn`'s testas, $p < 0,05$).

su dehidrotestosteronu DHT. Androstenediolis (A5) turėjo stiprią teigiamą koreliaciją ($r = 0,95$, $p = 0,23$) su vokalizacijos elgsenos proporcija (Voc). Žindymo laikotarpiu tarp kūno masės (kg) ir vidutinio amžiaus (dienių) reikšminga koreliacija nerasta nei su elgsena, nei su skirtingų steroidinių hormonų koncentracija.

Budrumo būseną (A), nesocialus tyrinėjimas (NI) ir ramybės būseną (R) buvo dažniausiai badavimo laikotarpiu stebima elgsena ($n = 5$) (10b pav.). Nustatyti reikšmingi skirtumai tarp skirtingo elgesio proporcijų (Friedmano $\chi^2 = 36,59$, $df = 8$, $p < 0,001$). Po MW Dunn korekcijos buvo nustatyti reikšmingi skirtumai tarp NI ir SI_C, Voc ir SI_D. Taip pat, reikšmingai skyrėsi SI_C ir R bei SI_D ir R dalis elgsenos repertuare. Nustatyta stipri teigiama koreliacija tarp R_CM ir 11-deoksikortizolio (11-deoksiCOR, $r = 0,9$, $p = 0,037$). Tiek 11-deoksikortikosteronas (DOC), tiek kortikosteronas (COS) identišškai teigiamai koreliavo su socialiniu tyrinėjimu per kontaktą (SI_C) ($r = 0,98$, $p < 0,01$) bei socialiniu tyrinėjimu per atstumą (SI_D) ($r = 1$, $p < 0,001$) ir vokalizacija (Voc) ($r = 0,89$, $p = 0,04$). SI_C dalis teigiamai koreliavo ($r = 0,9$, $p = 0,04$) su dehidrotestosteronu, o SI_D koreliacija buvo neigiama su dihidroepiandrosteronu (DHEA) ($r = -0,89$, $p = 0,04$). Androstenedionas (AN) turėjo stiprią teigiamą koreliaciją ($r = 0,89$, $p = 0,04$) su nesocialinio žaidimo (NP) elgsena. Šį kartą buvo nustatyta reikšminga teigiama koreliacija tarp vidutinės jauniklių kūno masės (kg) ir Voc ($r = 0,89$, $p = 0,04$), o neigiama su R_CM ($r = -0,9$, $p = 0,04$) ir 17α -hidroksiprogesteronas (17α -OHP) ($r = 0,9$, $p = 0,037$). Koreliacijos tarp vidutinio amžiaus (dienių) mėginių ėmimo procedūros metu po nujunkymo nenustatyta nei su elgesio proporcija, nei su skirtingų steroidinių hormonų koncentracija.

2.3. DISKUSIJA

Informacija apie steroidų koncentraciją laukinių irklakojų žinduolių organizme ir ją veikiančius veiksniai gali padėti lengviau prognozuoti ir vertinti jų veisimosi, mitybos ir streso būklę (Bennett ir kt., 2013; Kershaw ir Hall, 2016) bei elgseną (Klein ir kt., 1997). Šis tyrimas yra pirmasis bandymas išmatuoti pilkųjų ruonių jauniklių

lytinius ir streso steroidus dviejose skirtingose matricose – seilėse ir plazmoje. Seilės iki šiol nebuvo naudojamos laisvėje gyvenančių ruonių steroidų koncentracijai vertinti. Tyrimo metu nustatyta, kad estradiolis, testosteronas ir kortizolis yra aptinkamas ir gali būti išmatuojamas net jaunų pilkųjų ruonių jauniklių seilėse. Vis dėlto, nors iš pirmo žvilgsnio seilės atrodo perspektyvi analitinė pilkųjų ruonių steroidinių hormonų tyrimo matrica, seilių surinkimas trunka ilgiau nei kraujo, jos gali būti lengvai užteršiamos krauju bei kitomis priemaišomis, atsitiktinai patekusiomis mėginių ėmimo metu. Kitaip nei kraujui, seilėms surinkti gyvūnai turi būti ilgiau tramdomi ir/ arba slopinami anestetikais, tačiau net ir skyrus daugiau pastangų bei laiko seilėms surinkti, pakankamas kiekis surinktas tik 60 % mėginių ėmimo atvejų, palyginti su 100 % kraujo. Taip pat iš tų surinktų mėginių tik 84 % pasiekė vienam hormonui rekomenduotiną 0,5 ml ar didesnę kiekį, ir tik 3 % mėginių pasiekė trims hormonams rekomenduojamą 1,5 ml tūrį. Žemą seilių produkciją galėtų paaiškinti rūšiai specifiniai bruožai (pilkieji ruoniai pagrindinį savo grobį ryja, nekramto), stresas, dėl to gali sumažėti seilių kiekis arba anestezijos poveikis. Theodorou ir Atkinson (1998) savo tyrimo nelaisvėje metu pastebėjo, kad anestezuotas ruonis išskyrė žymiai mažesnę, steroidų analizei nepakankamą seilių kiekį, nei nesant anestezijos. Seilių paruošimas iki analizės buvo paprastesnis, nei kraujo, vis tik apibendrinus anksčiau išdėstytus rezultatus galima teigti, kad laukinių ruonių seilių rinkimo metodas nėra „neinvazinis“ ir negali būti pateisinamas. Apibendrinus visą surinkimo procedūrą laisvės sąlygomis ir mėginių paruošimą, laisvėje gyvenančių pilkųjų ruonių jauniklių seilių rinkimas nerekomenduojamas, nebent: 1) gyvūnai anestezuojami dėl kitos priežasties; 2) per tą laiką galima gauti seilių taip, kad būtų kuo mažiau kraujo ir kitokio užteršimo; 3) numatoma analizei gaunamas pakankamai didelis tūris.

Šio darbo metu taip pat nustatyta, kad estrogeno ir kortizolio koncentracija pilkųjų ruonių jauniklių plazmoje ir seilėse gali būti išmatuojama priimtiniu tikslumu, o šių hormonų koncentracijos seilėse ir plazmoje koreliavo tarpusavyje. Vis tik, nors kortizolis turėjo gerą

teigiamą koreliaciją tarp dviejų matricų nepriklausomai nuo mėginio rinkimo metų ar naudotos lėkštelės, estradiolio koreliacija tarp dviejų matricų priklausė tiek nuo naudotos lėkštelės, tiek mėginio rinkimo metų. Šis koreliacijos nevienodumas galėtų būti aiškinamas gauta labai žema plazmos estradiolio koncentracija vėlesniais metais, turėjusia neigiamos įtakos koreliacijos jautrumui (Stanczyk ir kt., 2003).

Testosterono plazmos tyrimai buvo ne tokie sėkmingi. Nors TB praskiedimo efektyvumas ir seilių bei plazmos koncentracijos išgavimo rodikliai variavo nuo priimtinių iki puikių, testosterono koncentracijų preciziškumas arba atsikartojamumas tarp plazmos tyrimo lėkštelių buvo labai prastas – vidutinis inter-CV siekė net 86 %. Šiuos testosterono koncentracijos skirtumus tarp analizuotų plokštelių galėjo nulemti skirtingas antikūnių, naudojamų ELISA šulinėlių padengimui, efektyvumas, atsiradęs skirtingose lėkštelių partijose, laboratorijos aplinkos svyravimai (Pavitt ir kt., 2014) ar testosterono koncentracijos pokyčiai laiko eigoje, nors paskutinė priežastis mažai tikėtina, nes išlieka stabilūs -20°C temperatūroje net 40 metų (Stroud ir kt., 2009). Taip pat nebuvo stebėta koreliacija tarp seilių ir plazmos testosterono koncentracijų. Nors šis faktas prieštarauja Theodorou ir Atkinson (1998) tyrimams, kur gauta stipri koreliacija tarp suaugusių Havajų ruonių vienuolių (*Neomonachus schauinslandi*) seilių ir plazmos, tačiau toks koreliacijos nebuvimas rastas ir keliose kitose gyvūnų rūšyse (Gröschl, 2008). Šį nesutapimą gali nulemti rūšiai specifinės steroidus surišančios medžiagos, skirtingas steroidų metabolizmas bei laisvo ir surišto testosterono santykis jaunuose individuose (Wong ir kt., 1992) ar žemos steroidų koncentracijos, dėl kurių, kaip ir estradiolio atveju, prarandamas jautrumas (Stanczyk ir kt., 2003). Taigi komerciniai ELISA rinkiniai yra tinkami estradiolio ir kortizolio koncentracijoms kraujuje bei seilėse, bei testosterono koncentracijoms seilėse, bet ne testosterono kiekiui plazmoje vertinti.

Vertinant steroidų koncentracijų jautrumą tarp skirtingų matricų, tiek seilių, tiek plazmos estradiolio ir kortizolio koncentracijos skyrėsi tarp mitybinių jauniklių stadijų, tačiau seilių estradiolio skirtumų tarp lyčių seilėse nerasta. Tuo tarpu moteriškos lyties jauniklių plazmos

estradiolio koncentracija buvo didesnė, nei vyriškos lyties jauniklių. Tad seilių estradiolio mažesnė skiriamoji geba lyties atžvilgiu apriboja jų panaudojimo naudingumą ateityje. Nepaisant kortizolio koncentracijos skirtumų tarp plokštelių, gauta panaši informacija tiek iš seilių, tiek iš plazmos, parodančių, kad pilkųjų ruonių jaunikliams kortizoliui identifikuoti žindymo metu ir po atjunkymo iš principo tinka bet kuri matrica.

Steroidų koncentracijos seilėse buvo panašios į anksčiau gautas kitose jūrinių žinduolių grupėse, nors tyrimų su irklakojų žinduolių seilėmis nėra daug. Seilių testosterono koncentracijos buvo panašios į nelaisvėje laikomų amazonės lamantinų (*Trichechus inunguis*) (Amaral ir kt., 2009) ir Havajų ruonių vienuolių (*Monachus schauinslandii*) (Theodorou ir Atkinson, 1998). Amazonės lamantinų patelių estradiolio koncentracija buvo keliasdešimt kartų mažesnė nei gauta šio tyrimo metu (Amaral ir kt., 2015). Delfinų seilių kortizolio koncentracijos buvo labai mažos, lyginant su gautomis šio tyrimo metu, tačiau panašios į Kergeleninio jūrų lokio (*Arctocephalus gazella*), kur seilių kortizolis variavo tarp 5-8 ng/ml priklausomai nuo sezono, tuo tarpu šio tyrimo metu ta variacija siekė tarp 10-30 ng/ml. Nors kitų jūrinių žinduolių plazmos steroidų koncentracijos varijuoja priklausomai nuo rūšies, tyrimo ar metodo, jos buvo pakankamai artimos šiame tyrime gautoms testosterono (Bartsh ir kt., 1992; Ferreira ir kt., 2005; Lydersen ir Kovacs, 2005), estradiolio (Lydersen ir Kovacs, 2005; Reijnders, 1990), tiek kortizolio (Bennett ir kt., 2012; Lidgard ir kt., 2008) koncentracijoms. Nepaisant analizės metodų skirtumų (dauguma steroidų tirti naudojant RIA), tiek seilių, tiek plazmos steroidų koncentracijos buvo palyginamos su anksčiau gautomis.

Plazmos kortizolio koncentracijos pasižymėjo stiprių ryšiu tarp dviejų skirtingų metodų (ELISA ir UPC₂-MS/MS), tačiau estradiolio koncentracijos tarp dviejų skirtingų metodų – ELISA ir RIA – nors ir teigiamai, tačiau nereikšmingai, koreliavo tarpusavyje. UPC₂-MS/MS metodas leido labai detalai ir tiksliai iširti kelis steroidus vienu metu, tačiau tam reikia daug išankstinio mėginių paruošimo, ilgesnio

analizės laiko, patyrusio personalo ir didesnių kaštų. Be to, jis nėra toks jautrus kaip RIA arba ELISA, kai matuojamos žemos vertės koncentracijos, pvz., estrogenai ar aldosteronas.

Žindomų ir atjunkytų pilkųjų ruonių jauniklių elgsenos repertuaras buvo panašus į anksčiau aprašytą (Kovacs, 1987), kur didžiausią elgsenos dalį sudarė poilsis. Pagrindinės socialinės sąveikos vyko žindymo ir motinos – jauniklio sąveikų metu, o tiesioginių kontaktų su kitais individais žindymo laikotarpiu nepastebėta. Nesocialinis tyrimas taip pat buvo pagrindinė nesociali veikla, kaip buvo pranešta ankstesniame tyrime. Akivaizdžiausias stiprus ir nuoseklus teigiamas ryšys buvo pastebėtas tarp kortikosterono (COS) ir socialinės elgsenos. Tie jaunikliai, kurių vidutinė COS koncentracija buvo didesnė, žindymo laikotarpiu ilgiau žindė (Sk1) arba kontaktavo su motina (MP). Panašiai ir atjunkyti jaunikliai, turintys didesnę COS koncentraciją, daugiau laiko skyrė socialiniam tyrinėjimui tiek per atstumą (SI_D), tiek per kontaktą (SI_C) bei vokalizacijai (Voc). Kortikosteronas yra labai svarbus žiurkių patelių elgsenai ir atminties formavimuisi po jauniklio atsivedimo (Graham ir kt., 2006; Rees ir kt., 2004). Tuo tarpu jauniklių kortikosterono koncentracija kinta priklausomai nuo motinos priežiūros intensyvumo: sumažėjus motinos priežiūrai, padidėja jauniklių kortikosterono koncentracija (Stanton ir Levine, 1988; Suchecki ir kt., 1995). Motinos buvimas (per oksitociną) sumažina kortikosterono koncentraciją ir skatina jauniklių prisirišimą (Moriceau ir Sullivan, 2006). Tai reikštų, kad pilkųjų ruonių jaunikliai, turintys didesnę kortikosterono koncentraciją, siekia motinos artumo per žindymą ar kitokį kontaktą su motina, arba, priešingai, motinos nebuvimas šalia iššaukia didesnę kortikosterono koncentraciją, tad ilgai išauga poreikis daugiau laiko praleisti su motina ar žindyti. Artumas ar kontakto palaikymas su kitu jaunikliu taip pat gali būti susiję su poreikiu sumažinti kortikosterono koncentraciją.

3. IŠVADOS

1. Didžiąją dalį socialinio žaidimo sąveikų sausumoje atliko jauni patinai (61,76 %) bei jaunos patelės (13,53 %). Didžiąją dalį socialinio žaidimo repertuaro sausumoje sudarė patinų kovos imitacijos elgsena, kaip imtynės (14 %), dažniausiai pasireiškianti paauglių patinų tarpusavio sąveikų metu.
2. Žaidimo sąveikų skaičiui reikšmingos įtakos turėjo tik grupės, kurioje dominavo suaugę patinai (50 %), dydis, sausumos plotas bei laikas arčiau veisimosi sezono.
3. Seilių mėginių ėmimas nereikalauja dūrio, pasižymi maža infekcijos rizika ir trumpa apdorojimo laboratorijoje trukme, tačiau pats surinkimas yra ilgesnis ir pasižymi mažesniu sėkmingumu, todėl yra labiau tinkamas dresuotiems nelaisvėje laikomiems gyvūnams.
4. Estradiolio ir kortizolio ELISA analizės rezultatai buvo geri, tad šie rinkiniai gali būti naudojami jaunų pilkųjų ruonių jauniklių steroidų tyrimams tiek seilėse, tiek kraujo plazmoje, tačiau seilių estradiolio skiriamoji geba buvo mažesnė nei kraujo plazmos; kraujo plazmos kortizolio, bet ne estradiolio, koncentracijos, gautos naudojant skirtingus analizės metodus, buvo suderinamos tarpusavyje.
5. Stipriausi ryšiai buvo rasti tarp gliukokortikoidų ir jauniklio elgsenos. Kortikosterono koncentracijos buvo teigiamai susijusios su pilkųjų ruonių jauniklių socialine elgsena, tuo tarpu 11-deoksikortizolio koncentracija teigiamai koreliavo su ramybės būsenos elgsena.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Altmann, J., 1974. Observational study of behavior: sampling methods. *Behaviour* 49, 227–67. <https://doi.org/10.1163/156853974X00534>
2. Amaral, R.S., Rosas, F.C.W., Viau, P., Neto, J.A. d’Affonsêca, Silva, V.M.F. da, Oliveira, C.A. de, 2009. Noninvasive Monitoring of Androgens in Male Amazonian Manatee (*Trichechus inunguis*): Biologic Validation. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 40, 458–465. <https://doi.org/10.1638/2008-0111.1>
3. Amaral, R.S., Rosas, F.C.W., da Silva, V.M.F., Graham, L.H., Viau, P., Nichi, M., Oliveira, C.A., 2015. Seasonal variation in urinary and salivary reproductive hormone levels in Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*). *Reproduction, Fertility and Development* 27, 1065–1071.
4. Arnold, W., Trillmich, F., 1985. Time budget in Galapagos fur seal pups: the influence of the mother’s presence and absence on pup activity and play. *Behaviour* 92, 302–321.
5. Auger, A.P., Olesen, K.M., 2009. Brain sex differences and the organization of juvenile social play behavior. *Journal of Neuroendocrinology* 21, 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.07.011>. In: *Innate*
6. Balčiauskas, L., 2021. Ilgasnukis ruonis (*Halichoerus grypus* (Fabricius 1971)), in: Rašomavičius, V. (Ed.), *Lietuvos Raudonoji Knyga*. Gyvūnai, Augalai Ir Grybai. Vilnius, p. 206.
7. Bartsh, S.S., Johnston, S.D., Siniff, D.B., 1992. Territorial Behavior and Breeding Frequency of Male Weddell Seals (*Leptonychotes weddelli*) in Relation to Age, Size, and Concentrations of Serum Testosterone and Cortisol. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie* 70, 680–692. <https://doi.org/10.1139/z92-102>
8. Beck, C.A., Bowen, W.D., Iverson, S.J., 2003. Sex differences in the seasonal patterns of energy storage and expenditure in a phocid seal. *Journal of Animal Ecology* 72, 280–291. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.2003.00704.x>
9. Bell, M.R., 2018. Comparing postnatal development of gonadal hormones and associated social behaviors in rats, mice, and humans. *Endocrinology* 159, 2596–2613. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00220>

10. Bennett, K.A., Fedak, M.A., Moss, S.E.W., Pomeroy, P.P., Speakman, J.R., Hall, A.J., 2013. The role of glucocorticoids in naturally fasting grey seal (*Halichoerus grypus*) pups: dexamethasone stimulates mass loss and protein utilisation, but not departure from the colony. *The Journal of experimental biology* 216, 984–91. <https://doi.org/10.1242/jeb.077438>
11. Bennett, K.A., Hughes, J., Stamatas, S., Brand, S., Foster, N.L., Moss, S.E.W., Pomeroy, P.P., 2015. Adiponectin and Insulin in gray Seals during suckling and fasting: Relationship with nutritional state and body mass during nursing in mothers and pups. *Physiological and Biochemical Zoology* 88, 295–310. <https://doi.org/10.1086/680862>
12. Bennett, K.A., Moss, S.E.W., Pomeroy, P., Speakman, J.R., Fedak, M.A., 2012. Effects of handling regime and sex on changes in cortisol, thyroid hormones and body mass in fasting grey seal pups. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 161, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.09.003>
13. Benoît, H., Swain, D., Bowen, W., Breed, G., Hammill, M., Harvey, V., 2011. Evaluating the potential for grey seal predation to explain elevated natural mortality in three fish species in the southern Gulf of St. Lawrence. *Marine Ecology Progress Series* 442, 149–167. <https://doi.org/10.3354/meps09454>
14. Bishop, A.M., Pomeroy, P., Twiss, S.D., 2015. Variability in individual rates of aggression in wild gray seals: fine-scale analysis reveals importance of social and spatial stability. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 69, 1663–1675. <https://doi.org/10.1007/s00265-015-1978-x>
15. Boness, D.J.J., James, H., 1979. Reproductive behaviour of the Grey seal (*Halichoerus grypus*) on Sable Island, Nova Scotia. *Journal of Zoology* 188, 477–500. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1979.tb03430.x>
16. Bowen, W.D., 2018. *Halichoerus grypus*. Grey seal foraging ecology View project Marine mammal foraging View project. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T9660A45226042.en>
17. Brasseur, S., Creuwels, J., Van der Werf, B., Reijnders, P., 1996. Deprivation indicates necessity for haul-out in harbor

- seals. *Marine Mammal Science* 12, 619–624. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1748-7692.1996.tb00077.x>
18. Breed, G.A., 2008. State-Space Analyses Indicate Experience, Prey Availability, Competition, and Reproductive Status Drive Foraging Behaviour in a Top Marine Predator. Department of Biology Doctor of.
 19. Breed, G.A., Jonsen, I.D., Myers, R.A., Bowen, W.D., Leonard, M.L., 2009. Sex-specific, seasonal foraging tactics of adult grey seals (*Halichoerus grypus*) revealed by state-space analysis. *Ecology* 90, 3209–3221.
 20. Burghardt, G.M., 2005. *The Genesis of Animal Play*. The MIT Press, Cambridge.
 21. Carter, M.I.D., McClintock, B.T., Embling, C.B., Bennett, K.A., Thompson, D., Russell, D.J.F., 2019. From pup to predator: generalized hidden Markov models reveal rapid development of movement strategies in a naïve long-lived vertebrate. *Oikos* 630–642. <https://doi.org/10.1111/oik.06853>
 22. Carter, M.I.D., Russell, D.J.F., Embling, C.B., Blight, C.J., Thompson, D., Hosegood, P.J., Bennett, K.A., 2017. Intrinsic and extrinsic factors drive ontogeny of early-life at-sea behaviour in a marine top predator. *Scientific Reports* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15859-8>
 23. Czerska, M., Zieliński, M., Kamińska, J., Ligocka, D., 2013. Effects of polybrominated diphenyl ethers on thyroid hormone, neurodevelopment and fertility in rodents and humans. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 26, 498–510. <https://doi.org/10.2478/s13382-013-0138-7>
 24. da Silva, J., Terhune, J.M., 1988. Harbour seal grouping as an anti-predator strategy. *Animal Behaviour* 36, 1309–1316. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(88\)80199-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-3472(88)80199-4)
 25. Davies, J.L., 1957. The Geography of the Gray Seal. *Journal of Mammalogy* 38, 297. <https://doi.org/10.2307/1376229>
 26. Donoghue, M.O., Boutin, S., 1995. Does Reproductive Synchrony Affect Juvenile Survival Rates of Northern Mammals? *OIKOS* 74, 115–121.
 27. Ferreira, A.P.S., Martínez, P.E., Colares, E.P., Robaldo, R.B., Berne, M.E. a, Miranda Filho, K.C., Bianchini, A., 2005. Serum

- immunoglobulin G concentration in Southern elephant seal, *Mirounga leonina* (Linnaeus, 1758), from Elephant island (Antarctica): Sexual and adrenal steroid hormones effects. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 106, 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.02.024>
28. Fossi, M.C., Marsili, L., 2003. Effects of endocrine disruptors in aquatic mammals. *Pure and Applied Chemistry* 75, 2235–2247. <https://doi.org/10.1351/pac200375112235>
 29. Garrett, J.N., Fish, F.E., 2015. Kinematics of terrestrial locomotion in harbor seals and gray seals: Importance of spinal flexion by amphibious phocids. *Marine Mammal Science* 31, 459–478. <https://doi.org/10.1111/mms.12170>
 30. Graham, M.D., Rees, S.L., Steiner, M., Fleming, A.S., 2006. The effects of adrenalectomy and corticosterone replacement on maternal memory in postpartum rats. *Hormones and Behavior* 49, 353–361. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.08.014>
 31. Gröschl, M., 2008. Current status of salivary hormone analysis. *Clinical Chemistry* 54, 1759–1769. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.108910>
 32. Hall, A.J., McConnell, B.J., Barker, R.J., 2002. The effect of total immunoglobulin levels, mass and condition on the first-year survival of Grey Seal pups. *Functional Ecology* 16, 462–474. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2002.00649.x>
 33. Hall, A.J., McConnell, B.J., Barker, R.J., 2001. Factors Affecting First-Year Survival in Grey Seals and Their Implications for Life History Strategy. *Journal of Animal Ecology* 70, 138–149.
 34. Hall, A.J., Russell, D.J.F., 2018. Gray Seal, in: *Encyclopedia of Marine Mammals*. Elsevier, pp. 420–422. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804327-1.00139-4>
 35. Haller, M. a., Kovacs, K.M., Hammill, M.O., 1996. Maternal behaviour and energy investment by grey seals (*Halichoerus grypus*) breeding on land-fast ice. *Canadian Journal of Zoology* 74, 1531–1541. <https://doi.org/10.1139/z96-167>
 36. Handa, R.J., Weiser, M.J., 2014. Gonadal steroid hormones and the hypothalamo–pituitary–adrenal axis. *Frontiers in Neuroendocrinology* 35, 197–220. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.11.001>

37. Harcourt, R., 2010. The Development of Play in the South American Fur Seal. *Ethology* 88, 191–202. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1991.tb00274.x>
38. Harcourt, R.G., Kingston, J.J., Cameron, M.F., Waas, J.R., Hindell, M. a., 2007. Paternity analysis shows experience, not age, enhances mating success in an aquatically mating pinniped, the Weddell seal (*Leptonychotes weddellii*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 61, 643–652. <https://doi.org/10.1007/s00265-006-0294-x>
39. Harding, K.C., Härkönen, T.J., 1999. Development in the Baltic Grey Seal (*Halichoerus grypus*) and Ringed Seal (*Phoca hispida*) Populations during the 20th Century. *Ambio* 28, 619–627.
40. Hastie, G.D., Donovan, C., Götz, T., Janik, V.M., 2014. Behavioral responses by grey seals (*Halichoerus grypus*) to high frequency sonar. *Marine Pollution Bulletin* 79, 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.12.013>
41. Hewer, H., 1964. The determination of age, sexual maturity, longevity and a life-table in the grey seal (*Halichoerus grypus*). *Proceedings of the Zoological Society of London* 593–630.
42. Hunt, K.E., Lysiak, N.S., Robbins, J., Moore, M.J., Seton, R.E., Torres, L., Loren Buck, C., 2017. Multiple steroid and thyroid hormones detected in baleen from eight whale species. *Conservation Physiology* 5, 1–14. <https://doi.org/10.1093/conphys/cox061>
43. Ikemoto, S., Panksepp, J., 1992. The effects of early social isolation on the motivation for social play in juvenile rats. *Developmental psychobiology* 25, 261–274. <https://doi.org/10.1002/dev.420250404>
44. Jenssen, B.M., 2006. Endocrine-disrupting chemicals and climate change: A worst-case combination for arctic marine mammals and seabirds? *Environmental health perspectives* 114 Suppl, 76–80. <https://doi.org/10.1289/ehp.8057>
45. Jenssen, B.M., 1996. An overview of exposure to, and effects of, petroleum oil and organochlorine pollution in Grey seals (*Halichoerus grypus*). *Science of The Total Environment* 186, 109–118. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(96\)05089-9](https://doi.org/10.1016/0048-9697(96)05089-9)
46. Jüssi, M., Härkönen, T., Helle, E., Jüssi, I., 2008. Decreasing Ice Coverage Will Reduce the Breeding Success of Baltic Grey Seal (*Halichoerus grypus*) Females. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 37, 80–86.

47. Keizer, R.J., Jansen, R.S., Rosing, H., Thijssen, B., Beijnen, J.H., Schellens, J.H.M., Huitema, A.D.R., 2015. Incorporation of concentration data below the limit of quantification in population pharmacokinetic analyses. *Pharmacology Research and Perspectives* 3, 1–15. <https://doi.org/10.1002/prp2.131>
48. Kershaw, J.L., Hall, A.J., 2016. Seasonal variation in harbour seal (*Phoca vitulina*) blubber cortisol - A novel indicator of physiological state? *Scientific Reports* 6, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep21889>
49. King, J., 1983. *Seals of the World*, The Journal of Wildlife Management, British Museum Natural History. Publication. British Museum (Natural History). <https://doi.org/10.2307/3799680>
50. Klein, S.L., Hairston, J.E., Devries, A.C., Nelson, R.J., 1997. Social environment and steroid hormones affect species and sex differences in immune function among voles. *Hormones and Behavior*. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1997.1402>
51. Kovacs, K.M., 1987. Maternal behaviour and early behavioural ontogeny of grey seals (*Halichoerus grypus*) on the Isle of May, UK. *Journal of Zoology* 213, 697–715. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1987.tb03735.x>
52. Kovacs, K.M., Lavigne, D.M., 1986. Growth of grey seal (*Halichoerus grypus*) neonates: differential maternal investment in the sexes. *Canadian Journal of Zoology* 64, 1937–1943. <https://doi.org/10.1139/z86-291>
53. Lang, S.L.C., Iverson, S.J., Bowen, W.D., 2011. The influence of reproductive experience on milk energy output and lactation performance in the grey seal (*Halichoerus grypus*). *PLoS ONE* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019487>
54. Leeney, R.H., Broderick, A.C., Mills, C., Sayer, S., Witt, M.J., Godley, B.J., 2010. Abundance, distribution and haul-out behaviour of grey seals (*Halichoerus grypus*) in Cornwall and the Isles of Scilly, UK. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 90, 1033–1040. <https://doi.org/10.1017/S0025315409991512>
55. Lidgard, D.C., Boness, D.J., Bowen, W.D., McMillan, J.I., 2008. The implications of stress on male mating behavior and success in a sexually dimorphic polygynous mammal, the grey seal. *Hormones and Behavior* 53, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.10.003>

56. Lydersen, C., Kovacs, K.M., 2005. Growth and population parameters of the world's northernmost harbour seals *Phoca vitulina* residing in Svalbard, Norway. *Polar Biology* 28, 156–163. <https://doi.org/10.1007/s00300-004-0656-7>
57. Martin, P., Bateson, P., 1993. *Measuring behavior: an introductory guide*, 3rd ed. Cambridge University Press, NY.
58. Meaney, M.J., Stewart, J., 1981. Neonatal-androgens influence the social play of prepubescent rats. *Hormones and behavior* 15, 197–213. [https://doi.org/0018-506X\(81\)90028-3](https://doi.org/0018-506X(81)90028-3) [pii]
59. Meier, H.E.M., Döscher, R., Halkka, A., 2004. Simulated distributions of Baltic Sea-ice in warming climate and consequences for the winter habitat of the Baltic ringed seal. *Ambio* 33, 249–256. <https://doi.org/10.1579/0044-7447-33.4.249>
60. Moriceau, S., Sullivan, R.M., 2006. Maternal presence serves as a switch between learning fear and attraction in infancy. *Nature Neuroscience* 9, 1004–1006. <https://doi.org/10.1038/nn1733>
61. Nordøy, E.S., Ingerbretsen, O.C., Blix, A.S., 1990. Depressed metabolism and low protein catabolism in fasting grey seal pups. *Acta Physiologica Scandinavica* 139, 361–369. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1990.tb08935.x>
62. Olesen, K.M., Jessen, H.M., Auger, C.J., Auger, A.P., 2005. Dopaminergic activation of estrogen receptors in neonatal brain alters progesterin receptor expression and juvenile social play behavior. *Endocrinology* 146, 3705–3712. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0498>
63. Pavitt, A.T., Walling, C.A., Mcneilly, A.S., Pemberton, J.M., Kruuk, L.E.B., 2014. Variation in early-life testosterone within a wild population of red deer. *Functional Ecology* 28, 1224–1234. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12260>
64. Pellis, S.M., Iwaniuk, A.N., 1999. The roles of phylogeny and sociality in the evolution of social play in muroid rodents. *Animal Behaviour* 58, 361–373. <https://doi.org/10.1006/anbe.1999.1141>
65. Pellis, S.M., Pellis, V.C., 1998. Play fighting of rats in comparative perspective: A schema for neurobehavioral analyses. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 23, 87–101. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(97\)00071-7](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(97)00071-7)

66. Pellis, S.M., Pellis, V.C., Bell, H.C., 2010. The function of play in the development of the social brain. *American Journal of Play* 2, 278–296.
67. Pomeroy, P.P., Fedak, M.A., Rothery, P., Anderson, S., 1999. Consequences of maternal size for reproductive expenditure and pupping success of grey seals at North Rona, Scotland. *Journal of Animal Ecology* 68, 235–253.
68. Puryear, W.B., Keogh, M., Hill, N., Moxley, J., Josephson, E., Davis, K.R., Bandoro, C., Lidgard, D., Bogomolni, A., Levin, M., Lang, S., Hammill, M., Bowen, D., Johnston, D.W., Romano, T., Waring, G., Runstadler, J., 2016. Prevalence of influenza A virus in live-captured North Atlantic gray seals: A possible wild reservoir. *Emerging Microbes and Infections* 5, 1–9. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.77>
69. Rees, S.L., Panesar, S., Steiner, M., Fleming, A.S., 2004. The effects of adrenalectomy and corticosterone replacement on maternal behavior in the postpartum rat. *Hormones and Behavior* 46, 411–419. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.03.010>
70. Reijnders, P.J.H., 1990. Progesterone and oestradiol-17 β concentration profiles throughout the reproductive cycle in harbour seals (*Phoca vitulina*). *Journals of Reproduction and Fertility* 90, 403–409.
71. Ruckstuhl, K., Neuhaus, P., 2002. Sexual segregation in ungulates: A comparative test of three hypotheses. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 77, 77–96. <https://doi.org/10.1017/S1464793101005814>
72. Ruiz-Cortes, Z.M., 2012. Gonadal Sex Steroids: Production, Action and Interactions in Mammals, in: M, O.S. (Ed.), *Steroids: From Physiology to Clinical Medicine*. pp. 3–44.
73. Sayer, S., Hockley, C., Witt, M.J., 2012. Monitoring grey seals (*Halichoerus grypus*) in the Isles of Scilly during the 2010 pupping season (August to December 2010), Natural England Commissioned Report NECR103.
74. Sjöberg, M., Ball, J.P., 2000. , habitat selection around haulout sites in the Baltic Sea: bathymetry or central-place foraging? *Canadian Journal of Zoology* 78, 1661–1667. <https://doi.org/10.1139/z00-108>

75. Solano, M.E., Arck, P.C., 2020. Steroids, Pregnancy and Fetal Development. *Frontiers in Immunology* 10, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03017>
76. Sørmo, E.G., Skaare, J.U., JÜSsi, I., JÜSsi, M., Jenssen, B.M., 2003. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in baltic and atlantic gray seal (*Halichoerus grypus*) pups. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 2789–2799. <https://doi.org/10.1897/02-556>
77. Stanczyk, F.Z., Cho, M.M., Endres, D.B., Morrison, J.L., Patel, S., Paulson, R.J., 2003. Limitations of direct estradiol and testosterone immunoassay kits. *Steroids* 68, 1173–1178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.steroids.2003.08.012>
78. Stanton, M.E., Levine, S., 1988. Maternal modulation of infant glucocorticoid stress responses: Role of age and maternal deprivation. *Psychobiology* 16, 223–228. <https://doi.org/10.3758/BF03327311>
79. Stroud, L.R., Papandonatos, G., Niaura, R., Lipsitt, L.P., LeWinn, K., Buka, S.L., 2009. Long-term stability of maternal prenatal steroid hormones from the National Collaborative Perinatal Project: Still valid after all these years. *Psychoneuroendocrinology*. 32, 140–150. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2006.11.008>. Long-term
80. Suchecki, D., Nelson, D.Y., Van Oers, H., Levine, S., 1995. Activation and inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the neonatal rat: Effects of maternal deprivation. *Psychoneuroendocrinology* 20, 169–182. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(94\)00051-B](https://doi.org/10.1016/0306-4530(94)00051-B)
81. Terhune, J.M., Brilliant, S.W., 1996. Harbour seal vigilance decreases over time since haul out. *Animal Behaviour* 51, 757–763. <https://doi.org/10.1006/anbe.1996.0080>
82. Theodorou, J., Atkinson, S., 1998. Monitoring total androgen concentrations in saliva from captive Hawaiian monk seals (*Monachus schauinslandi*). *Marine Mammal Science* 14, 304–310. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1998.tb00718.x>
83. Trippel, E. a., Wang, J.Y., Strong, M.B., Carter, L.S., Conway, J.D., 1996. Incidental mortality of harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) by the gill-net fishery in the lower Bay of Fundy. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53, 1294–1300. <https://doi.org/10.1139/cjfas-53-6-1294>

84. Twiss, S.D., 1991. Behavioral and energetic determinants of individual mating success in male grey seals (*Halichoerus grypus*, Fabricius 1791). University of Glasgow.
85. Twiss, S.D., Culloch, R., Pomeroy, P.P., 2012. An in-field experimental test of pinniped behavioral types. *Marine Mammal Science* 28, E280–E294. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2011.00523.x>
86. Vanderschuren, L.J.M.J., Trezza, V., 2013. What the Laboratory Rat has Taught us About Social Play Behavior: Role in Behavioral Development and Neural Mechanisms, in: *Curr Topics Behv Neurosci*. pp. 189–212. https://doi.org/10.1007/7854_2013_268
87. Vincent, C., Fedak, M. a., McConnell, B.J., Meynier, L., Saint-Jean, C., Ridoux, V., 2005. Status and conservation of the grey seal, *Halichoerus grypus*, in France. *Biological Conservation* 126, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.04.022>
88. Wilson, S.C., 1974. Juvenile play of the common seal *Phoca vitulina vitulina* with comparative notes on the grey seal *Halichoerus grypus*. *Behaviour* 48, 37–60. <https://doi.org/10.1163/156853974X00246>
89. Wolf, J.B.W., Mawdsley, D., Trillmich, F., James, R., 2007. Social structure in a colonial mammal: unravelling hidden structural layers and their foundations by network analysis. *Animal Behaviour* 74, 1293–1302. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2007.02.024>
90. Wong, T., Shackleton, C.H.L., Covey, T.R., Ellis, G., 1992. Identification of the steroids in neonatal plasma that interfere with 17α -hydroxyprogesterone radioimmunoassays. *Clinical Chemistry* 38, 1830–1837. <https://doi.org/10.1093/clinchem/38.9.1830>

TRUMPOS ŽINIOS APIE DISERTANTĄ

Vardas, pavardė: Vaida Survilienė

Gimimo data: 1987-05-09

Du vaikai (2014 ir 2018 metų gimimo)

Email: vaida.surviliene@gmail.com

Publikacijų sąrašas:

- *Survilienė, V., Rukšėnas, O., Pomeroy, P. P., Moss, S. E. W. & Bennett, K. A. 2022. Evaluating suitability of saliva to measure steroid concentrations in grey seal pups. General and Comparative Endocrinology, 326, 114070. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2022.114070>*
- *Survilienė, V., Rukšėnas, O. & Pomeroy, P. P. 2016. Play behavior of wild Grey seals: Effects of haul-out group size and composition. Aquatic Mammals, 42(2), 144-161. <https://doi.org/10.1578/AM.42.2.2016.144>*
- *Saint, S. T. L., Survilienė, V., Jüssi, M., Gonzalez, S. V., Ciesielski, T. M., Jenssen, B. M. & Asimakopoulos, A. 2022. Determination of steroid hormones in grey seal (*Halichoerus grypus*) blood plasma using convergence chromatography tandem mass spectrometry. Talanta, In Press: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124109>*

Tezių, pristatytų tarptautinėse konferencijose, sąrašas:

- *Survilienė, V., Sait, S.T.L, Asimakopoulos, A. G., Bennet, K., Moss, S., Pomeroy, P., Rukšėnas, O., Jenssen, B.M. & Ciesielski, T. M. 2022. Steroid hormone profiles in grey seal pups during the suckling period and postweaning fast using SFC-MS/MS. 24th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals, rugpjūčio 1-5, Florida, USA.*
- *Survilienė, V., Moss, S. & Rukšėnas, O. Changes in saliva steroid hormone levels of grey seal pups during lactation and post-weaning fast. World Marine Mammal Conference, gruodžio 9-12, 2019, Barcelona, Spain.*

- Stukonytė, L., Pomeroy, P., Twiss, S., Mozgeris, G., Rukšėnas, O. & Survilienė, V. Evidence of group density effect on behavioural differences in grey seal (*Halichoerus grypus*) neonates during lactation period. World Marine Mammal Conference, gruodžio 9-12, 2019, Barcelona, Spain.
- Survilienė V., Pomeroy P., Moss, S. & Rukšėnas O. The comparative analysis of steroid hormones in saliva and blood from grey seal (*Halichoerus grypus*) pups. 22nd Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals, spalio 22-27, 2017, Halifax, Canada.
- Survilienė, V., Moss S., Pomeroy P. & Rukšėnas O. The analysis of steroid hormones in saliva and blood from grey seal (*Halichoerus grypus*) pups. 20th Anniversary Conference Laboratory Animals in Research, lapkričio 24-25, 2016, Vilnius, Lietuva.
- Survilienė, V., Pomeroy, P., Moss S. & Rukšėnas, O. The use of saliva samples to estimate levels of steroids in grey seal (*Halichoerus grypus*) pups. Conference of Life Sciences Baltic, Vilnius, 2016.

Išsilavinimas:

- 2013-2022 m. – Biologijos krypties doktorantūros studijos, Vilniaus universitetas.
- 2010-2012 m. – Zoologijos magistro studijos, Vilniaus universitetas.
- 2006-2010 m. – Biologijos bakalauro studijos, Vilniaus universitetas.

Darbo patirtis:

- Nuo 2013 m. – jaunesnioji mokslo darbuotoja/ jaunesnioji asistentė, Vilniaus universitetas.
- 2014-2015, 2019-2020 m. projektų vadovė, Lietuvos gamtos fondas.

Gautas finansavimas:

- 2013 m. – Society for Marine Mammalogy Grants in Aid of Research.
- 2014 m. – parama įrangai gauti, IDEA WILD (<http://www.ideawild.org/>).

Stažuotės:

- 2020 m. – stažuotė NTNU (Norvegijos mokslo ir technologijų universitetas), Norvegija.

- 2020 m. – pilkųjų ruonių tyrimų galimybių analizė, Saarema, Estija.
- 2009 – 2017 m. – pilkųjų ruonių elgsenos ir fiziologinių duomenų rinkimas Isle of May saloje, Škotijoje.
- 2009 m. – pilkųjų ruonių elgsenos duomenų rinkimas, Erasmus praktika, Škotija.

Vadovavimas baigiamiesiems bakalauro darbams Vilniaus universitete:

- Dikaitė, G. 2022 Atjunkytų pilkųjų ruonių (*Halichoerus grypus*) jauniklių judėjimo greitį ir agregacijų formavimąsi „badavimo“ laikotarpiu veikiantys veiksniai, 38 psl.
- Ricart, J. O. 2022. Ankstyvosios socialinės pilkųjų ruonių (*Halichoerus grypus*) elgsenos formavimasis, 44 psl.
- Valaitis, L. 2021. Grupės tankio žindymo laikotarpiu įtaka pilkųjų ruonių (*Halichoerus grypus*) jauniklių asociacijų sudarymui, 50 psl.
- Jarmontovičiūtė, G. 2020. Pilkųjų ruonių apsilankymų dažnio Lietuvos pakrantėje ir poveikio žvejybos efektyvumui nustatymas remiantis žvejybos žurnalų duomenimis, 79 psl.
- Stukonytė, L. 2019. Faktoriai, veikiantys pilkųjų ruonių (*Halichoerus grypus*) jauniklių elgseną žindymo laikotarpiu, 57 psl.
- Jasaitė, E. 2019. Faktoriai, veikiantys pilkųjų ruonių (*Halichoerus grypus*) jauniklių elgsenos formavimąsi „badavimo“ laikotarpiu, 46 psl.

UZRAŠAMS

UZRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
Tiražas 12 egz.