



VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Agija Poškutė

**Estradiolio koncentracijos ir hematologinių rodiklių sąsaja Baltijos
pilkujų ruonių (*Halichoerus grypus*) jaunikliuose**

Magistro baigiamasis darbas

Neurobiologijos studijų programa

Darbo vadovė

Dr. Vaida Survilienė

Darbas atliktas

Neurobiologijos ir biofizikos katedroje

Vilnius

2025

Turinys

Santraukos.....	4
1. Literatūros apžvalga	7
1.1 Baltijos jūros pilkųjų ruonių biologija	7
1.2 Steroidiniai hormonai ir jų vaidmuo	9
1.2.1 Kortizolis	9
1.2.2 Progesteronas	9
1.2.3 Estradiolis	10
1.3. Organinių teršalų įtaka steroidiniams hormonams	11
1.4 Hormonai besivystančiuose ruoniuose	12
1.5 Ruonių jaunikių hematologija	13
1.5 Estradiolio ir baltųjų kraujo kūnelių sąveika	15
2. Medžiagos ir metodai.....	16
2.1 Estradiolio tyrimas ELISA metodu.....	18
2.1.1 Estradiolio koncentracijos nustatymas Arbor kit rinkiniu	18
2.1.2 Estradiolio koncentracijos nustatymas su ekstrahuotais ir neekstrahuotais mėginiais naudojant Tecan kit rinkinį	19
2.2 Kraujo morfologinė analizė.....	20
2.2.1 Baltųjų kraujo ląstelių analizė	20
WBC skaičiavimas rankiniu būdu	20
2.2.1.1.....	20
2.2.2.2 WBC skaičiavimas analizatoriumi.....	21
2.2.3 Statistinė analizė	21
3. Rezultatai	23
3.1 Estradiolio analizė	23
3.1.1 Estradiolio Elisa rinkinių palyginimas tarpusavyje	23
3.1.2. Estradiolio priklausomybė nuo skirtingų veiksnių	23
3.2 Baltųjų kraujo ląstelių analizė.....	27
3.2.1. WBC skaičiavimo metodų palyginimas	27
3.2.2 Kraujo baltųjų ląstelių tarpusavio sąveika	29
3.2.2 Monocitai	30
3.2.3 Eozinofilai	31

3.2.4 Bazofilai	31
3.2.5 Neutrofilai	32
3.2.6 Limfocitai	32
3.3 Estradiolio ir hematologinių parametų tarpusavio analizė	33
4. Rezultatų aptarimas	35
4.1 Estradiolio koncentracijų dinamika.....	35
4.2 Metodų taikymo vertinimas ir rekomendacijos	36
4.3 Kraujo parametų pokyčiai	36
4.4 Apibendrinimas.....	37
Autoriaus asmeninis indėlis	38
Išvados.....	39
Literatūra	42
Priedas 1	48

Santraukos

A_WBC – analizatoriumi skaičiuotos baltosios kraujo ląstelės

COP – chlororganiniais pesticidais

DDD – dichlordifenildichlorešanas

DDE – dichlordifenildichlorešanas

DDT – dichlordifeniltrichlorešanas

ELISA – imunofermentinė analizė

HCB – heksachlorbenzenai

LOD – aptikimo riba (*angl. limit of detection*)

M_WBC – rankiniu būdu skaičiuotos baltosios kraujo ląstelės

PCB – polichlorinti bifenilai

POP – patvarieji organiniai teršalai (*angl. Persistent organic pollutants*)

WBC – baltieji kraujo kūneliai

Ivadas

Baltijos jūra yra pusiau uždaras druskingo vandens baseinas, kuris susiformavo kaip ledinis gėlo vandens ežeras po paskutinio ledynmečio atsitraukimo ir nuo to laiko pakaitomis buvo druskinga jūra ir gėlo vandens ežeras. Šios jūros zooarcheologinių tyrimų duomenimis aptiktos penkios jūrų žinduolių rūšys tarp kurių yra ir pilkasis ruonis (lot. *Halichoerus grypus*) (Ahlgren, et al., 2022). Būtent pastarasis yra didžiausias žinduolis gyvenantis Baltijos jūroje (HELCOM, 2023), be to jie užima aukščiausią vietą Baltijos jūros mitybos grandinėje, todėl yra svarbūs ekosistemos būklės indikatoriai (Weitzman, Jenny, et al., 2017). Kaip viršūniniai plėšrūnai, jie kaupia riebaliniame audinyje ilgai išliekančius teršalus, tokius kaip PCB ir DDT, kurie gali turėti įtakos jų sveikatai ir reprodukcijai. Teršalai gali imituoti hormoninius kelius tikių androgenų ar estrogenų kaip estradiolis ((Vanden Berghe, et al., 2010). Dėl šios priežasties pilkieji ruoniai dažnai naudojami kaip biologiniai indikatoriai, vertinantys jūros aplinkos užterštumą ir ekosistemos sveikatą (Salcedo, S., et al., 2024). Estrogenai, be savo pagrindinio vaidmens reprodukcinėje sistemoje, veikia ir imuninę sistemą – jie gali moduluoti uždegiminius atsakus, citokinų gamybą bei imuninių ląstelių aktyvumą. Tyrimai rodo, kad estrogenai gali daryti įtaką kraujo sudėčiai, kaip pavyzdžiui limfocitų, monocitų ir neutrofilų skaičiui, taip prisidedami prie imuninės homeostazės palaikymo (Lim, et. al, 2021).

Žvelgiant į esamą mokslinę literatūrą, akivaizdu, kad didžioji dalis tyrimų apie teršalų poveikį yra sutelkta į suaugusių individų fiziologinius atsakus, tačiau žinoma, kad jauniklių vystymosi laikotarpis, kuris ypač jautrus hormoniniams sutrikimams išlieka menkai ištirtas. Neaiški išlieka polichlorintų teršalų įtaka steroidinių hormonų, tokių kaip estradiolis, pusiausvyrai. Taip pat estradiolio sąsaja su imunologiniais procesais besivystančių jūrinių žinduolių organizme. Atsižvelgiant į tai, kad estradiolis gali turėti tiesioginį poveikį kraujo ląstelių proliferacijai ir imuninės sistemos veiklai. Šiame darbe siekta išsamiau ištirti pilkųjų ruonių jauniklių estradiolio koncentracijų bei kraujo parametrų sąsajas skirtingose vystymosi stadijose. Tyrime siekta ištirti sąsają tarp endokrininių ir imuninių veiksmų ankstyvame ontogenezės laikotarpyje, kuris yra itin svarbus jauniklių sveikatai, augimui ir prisitaikymui prie aplinkos pokyčių Baltijos jūroje.

Darbo tikslas: ištirti pilkųjų ruonių jauniklių steroidinio hormono ir kraujo parametrų pokyčius ankstyvosios ontogenezės metu.

Darbo uždaviniai:

1. Palyginti skirtingus ELISA gamintojų rinkinius, siekiant įvertinti estradiolio koncentracijas pilkųjų ruonių jauniklių kraujo mėginiuose.
2. Nustatyti ir palyginti rankinio skaičiavimo ir analizatoriaus pilkųjų ruonių jauniklių hematologinius parametrus.
3. Įvertinti estradiolio koncentracijų pokyčius ir sąsają su kitais morfometriniais ir fiziologiniais rodikliais ankstyvosios ontogenezės metu.
4. Įvertinti estradiolio ryšį su hematologiniais parametrais.

1. Literatūros apžvalga

1.1 Baltijos jūros pilkųjų ruonių biologija

Pilkieji ruoniai pasaulyje sutinkami 3 vietose: vakarinėje Šiaurės Atlanto dalyje (rytinė Kanados dalis ir Jungtinių Amerikos Valstijų šiaurės rytinė dalis), rytinėje Šiaurės Atlanto dalyje (Didžioji Britanija, Islandija, Norvegija, Danija, Farerų salos) ir Baltijos jūroje. Pilkieji ruoniai išsilaipina tokiose vietose kaip uolėtos pakrantės, salos, smėlio paplūdimiai, ledo šelfai ar ledkalniai (NOAA, 2024).

Pilkasis ruonis yra vidutinio dydžio, tvirto kūno, stačiakampio formos, pailga, kūgio formą pereinančia galva ir mažomis plačiais atskirtomis akimis. Šnervės sudaro W raidės formą, nes yra lygiagrečios ir plačiai viena nuo kitos nutolusios. Jų snukis ilgas, platus, su masyvia sritimi aplink ūsus, uždengiančia apatinį žandikaulį. Suaugusių patinų snukio viršus išgaubtas, o suaugusių patelių ir jauniklių - plokščias. Suaugėliai gali užaugti iki 2 m ilgio, o naujagimių jaunikliai būna apie 1 m ilgio (Edwards, 2008). Ši rūšis pasižymi lytiniu dimorfizmu: subrendę patinai sveria nuo 170 iki 310 kg, o suaugusios patelės - nuo 100 iki 190 kg. Vakarų Atlanto vandenyno populiacijos individai yra gerokai stambesni už rytinės Atlanto dalies populiacijos individus; patinai gali sverti daugiau kaip 400 kg, o patelės - daugiau kaip 250 kg. (Perrin et al., 2009). Suaugę patinai yra tamsesnės spalvos nei patelės, kailis ant nugaros tamsiai pilkas, o apačioje - šviesiai pilkas, su netaisyklingu dėmių ar dėmelių raštu (1 pav.) (Edwards, 2008).



1 pav. Pilkojo ruonio patinas, patelė ir jauniklis (*Halichoerus grypus*) (Hall & Russell, 2018).

Pilkieji ruoniai renkasi į dideles grupes poravimosi ir veisimosi metu. Likusią metų dalį juos galima sutikti pavienius, mažomis grupelėmis arba didelėmis grupėmis gulyklose sausumoje ar jūroje (Winsnes, 2023). Pilkieji ruoniai gali panerti į 301 metrų gylį ir išbūti po vandeniu iki valandos. Vidutiniškai per dieną jie gali suvartoti 4-6 proc. savo kūno masės maisto, tačiau poravimosi laikotarpiu

jie nevalgo (NOAA, 2024). Dėl puikaus regėjimo ir klausos ruoniai yra geri medžiotojai. Jie minta žuvimis (daugiausia smiltiniais unguriais, lydekomis, merlangais, menkėmis, menkėmis ir plekšnėmis), vėžiagyviais, kalmarais, aštuonkojais, kartais net jūrų paukščiais (Gårdmark, et al., 2012). Jų mityba priklauso nuo amžiaus, lyties, sezono ir geografinio regiono (NOAA, 2024).

Pilkieji ruoniai gyvena nuo 25 (patelės) iki 35 (patinai) metų (Beck, Carrie, et al., 2007). Jie renkasi į dideles grupes poruotis. Patinai, veisiasi sausumoje poligamiškai, tai reiškia, per vieną veisimosi sezoną gali susiporuoti su daugeliu skirtingų patelių (Pomeroy, et al., 2000). Patelių nėštumas trunka apie 11 mėnesių, kurio pabaigoje atsiveda vieną jauniklį. Rytinėje Atlanto vandenyno dalyje patelės jauniklius veda rugsėjo-lapkričio mėnesiais, o vakarinėje Atlanto vandenyno dalyje - gruodžio-vasario mėnesiais. Baltijos jūroje patelės jauniklius veda kovo mėnesį (Kauhala ir Kurkilahti, 2019). Gimę pilkieji ruoniukai sveria apie 11-15 kg (Boshoven, 2024). Maždaug tris savaites jie maitinami riebiu pienu. Per tą laiką jie priauga apie tris kilogramus per dieną ir užsiaugina storą riebalų sluoksnį. Kaip minėta anksčiau, maitindamos jauniklius patelės nesimaitina, todėl prieš susilaukdamos jauniklių, turi užsiauginti storą riebalų sluoksnį (NOAA, 2024). Pilkujų ruonių, brendimo laikotarpis susideda iš 5 stadijų: 1, 2, 3, 4, 5 (1 lentelė). Žindymo periodas trumpas, t. y. apie 15-18 dienų. Atjunkymas būna staigus ir jaunikliai 1 - 4 savaites badauja sausumoje. Badaujant pilkujų ruonių jaunikliai daugiau nei 90 % energijos sąnaudų gauna iš riebalų katabolizmo. Tai reiškia, kad pilkujų ruonių jaunikliai gali badauti vidutiniškai 6 savaites, kol riebalų atsargos išseks (Bennett et. al., 2007).

1 lentelė. Ruonių jauniklių brendimo stadijos (Jenssen et al., 2010).

Stage	Morphological description	Age mean±SD (N)
Stage 0	Newborn; traces of birth (blood on or near pup, placenta present)	0
Stage 1	Body contour thin, neck well defined, skin in loose folds around body	2±1 (4)
Stage 1+	Body contour as Stage 1. Umbilicus dried and atrophied, but still clearly present, white to brownish	5±1 (12)
Stage 2	Body contour resembling Stage 1, but smoother. Umbilicus not present	8±4 (58)
Stage 2+	Outline smoother; shoulder to hip region filled out. Neck still recognizable	10±4 (41)
Stage 3	Outline rounded to barrel-shaped. Neck indistinguishable	12±4 (109)
Stage 3+	Outline as Stage 3. Lanugo intact, except for slight loss in the facial region. Some hair loss when handled	16±5 (32)
Stage 4	Outline as Stage 3+. Lanugo being shed, exposing patches of juvenile pelage. Less than 50% of lanugo moulted	17±5 (109)
Stage 4+	50–95% of lanugo moulted	22±7 (32)
Stage 5	Moulted pup, less than 5% of the body surface still retaining lanugo	25±7 (33)

Veisimosi laikotarpiu žindančios pilkujų ruonių patelės ir jaunikliai didžiąją laiko dalį praleidžia ant kranto (Jenssen et al., 2010). Nutraukusios žindymą, patelės palieka jauniklius ir išplaukia į jūrą.

1.2 Steroidiniai hormonai ir jų vaidmuo

Steroidiniai hormonai yra hormonai, gaminami steroidinių liaukų tipuose: antinksčių žievėje, sėklidėse ir kiaušidėse, o nėštumo metu – placentoje (Britanica, 2024). Tokio tipo hormonai yra cikliniai cheminiai junginiai, sudaryti iš anglies atomų žiedų, kurie atlieka esminį vaidmenį įvairiose fiziologinėse funkcijose, įskaitant augimą, vystymąsi, energijos apykaitą, homeostazę ir reprodukciją (Adhya et al., 2018).

Steroidiniai hormonai yra ypatingai svarbus veiksnys ruonių jauniklių brendimo laikotarpiu, taip pat labai svarbus reaguluojant atsaką į stresą (Ojoghero et al., 2021). Remiantis struktūrinėmis savybėmis, stuburinių steroidai gali būti suskirstyti į penkias klases: androgenus, estrogenus, gliukokortikoidus, mineralokortikoidus ir progestagenus (Ojoghero et al., 2021). Jūrinių žinduolių, tokių kaip ruonių jaunikliai, ELISA metodu aptinkami hormonai yra kortizolis, kortizonas, kortikosteronas, 11-deoksikortizolis, progesteronas ir 17α -hidroksiprogesteronas (Sait et al., 2023), nedidelėmis koncentracijomis taip pat aptinkamas ir estradiolis. Lytiniai hormonai, tokie, kaip estrogenas ir androgenas, vaidina svarbų vaidmenį žinduolių naujagimių vystymosi procesuose. Pavyzdžiui, padidėjusi testosterono koncentracija vyriškos lyties naujagimių organizme atlieka svarbų vaidmenį lytinių organų vystymuisi (Sherman-Cooney et al., 2005).

1.2.1 Kortizolis

Kaip jau minėta anksčiau, ruonių jaunikliai pasninkaudami sausumoje turi kruopščiai paskirstyti savo energijos resursus, kad į jūrą išplauktų turėdami pakankamai energijos iki patys sugebės rasti maisto (Bennett et al., 2007). Gliukokortikoidai (GK), o ypač kortizolis yra susijęs su energijos apykaitos kontrole ir streso valdymu (Bennett et al., 2012). Manoma, kad ruonių jauniklių išgyvenimą lemia gebėjimas tinkamai reaguoti į stresą. Lėtinis stresas gali neigiamai paveikti kortizolio ir skydliaukės hormonų, kurie padeda kontroliuoti energijos panaudojimą, sekreciją (Bennett et al., 2012).

1.2.2 Progesteronas

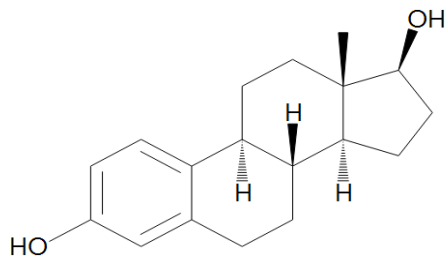
Progesteronas yra endogeninis steroidinis hormonas, kurį paprastai gamina antinksčių žievė ir gonados. Šis hormonas dalyvauja rujos ir menstruacijų ciklo metu (Cable ir Grider, 2023). Menstruacijų ciklo metu progesteronas skatina gimdos kaklelio ląstelių proliferaciją (Bäcklin et al., 2003). Taip pat vėlyvajame nėštume progesteronas yra aptinkamas placentoje. Šio hormono koncentracija ruoniuose buvo susieta su nėštumo trukme, vaisiaus lytimi ir dydžiu bei gonadų ir placentos svoriu (Hobson ir Boyd, 1984). Be to, progesteronas dalyvauja uždelstame implantacijos reiškinyje (angl. *delayed*

implantation), kuris leidžia kiaušinėliui esančiam gimdoje implantuotis ne iš karto, o tik tada, kai bus sulaukta palankių sąlygų nėštumui (Boyd, 1991).

1.2.3 Estradiolis

Estradiolis yra natūralus steroidinis estrogenas, kurį gamina žinduolių endokrininės liaukos. Jis būtinas menstruacinio ciklo, širdies ir kraujagyslių sistemos, neurologinės sistemos, skeleto sistemos ir kraujagyslių sistemos reguliavimui (Hariri ir Rehman, 2023, PubChem, 2023). Estradiolis yra gausiausias estrogenas, kuris nėštumo metu atlieka daugybę funkcijų, pavyzdžiui, per receptorius skatina mažos molekulinės masės cholesterolio (MMC, angl. *Low-density lipoprotein*) įsisavinimą placentos steroidų gamybai, didina gimdos ir placentos kraujotaką ir ruošia krūties audinį laktacijai, didindamas prolaktino sintezę ir sekreciją (Castillo-Castrejon et al., 2018).

Šiuo metu estradiolis labiausiai ištirtas suaugusiuose patelėse, bet labai nedaug žinoma apie jo vaidmenį jauniklių organizmuose. Dėmėtųjų ruonių (lot. *Phoca Largha*) jaunikliuose, kurie yra lytiškai nesubrendę, estradiolis yra praktiškai neaptinkamas (Zhang et al., 2014), o štai kituose jūros gyvūnuose, tokiuose kaip jūrų drambliai (lot. *Mirounga angustirostris*), naujagimių vystymosi metu estradiolio kiekis padidėja jaunikliuose, bet badavimo metu ar esant maisto trūkumui steroidogenezės procesai yra slopinami (Sherman-Cooney et al., 2005). 17β-estradiolis nedidelėmis koncentracijomis aptinkamas ir pilkųjų ruonių jaunikliuose (Survilienė, et al., 2022). Šis hormonas susijęs su žindymo laikotarpiu, jo metu padidėja estradiolio koncentracija, kuri yra susijusi su imuninės sistemos veikla ir sukelia su lytimi susijusį atsparumą helmintų parazitų infekcijai. Pastebėta, kad didesnės estradiolio koncentracijos aptinkamos moteriškos lyties jaunikliuose (Survilienė, et al., 2022). Šių gyvūnų organizmuose estradiolis siejamas su genais, kurie skatina ląstelių proliferaciją ir diferenciaciją, organų vystymusi, augimu ir reprodukcija (2 pav.) (Noël et al., 2017; Sait et al., 2023).



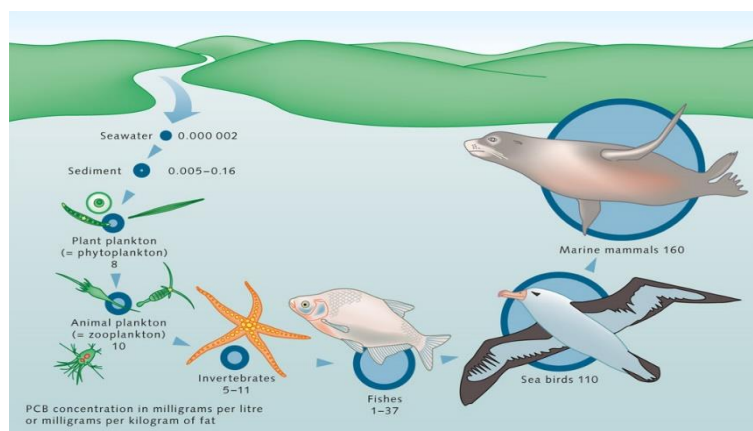
2. pav. 17β-estradiolio cheminė formulė (LGC Standards , 2023).

Taigi, steroidiniai hormonai vaidina labai svarbią rolę jūros gyvūnų organizmuose. Tokio tipo hormonai dalyvauja streso valdymo, elgesio vystymosi, lyties vystymosi, homeostazės ir reprodukcijos procesuose.

1.3. Organinių teršalų įtaka steroidiniams hormonams

Šiuo metu vis dažniau aptarinėja problema yra jūrų ir vandenynų tarša. Kasmet į vandenyną patenka milijardai kilogramų šiukšlių ir kitų teršalų, tokių kaip trąšos, šiukšlės, mikroplastikas, nafta ir organiniai teršalai (Ocean Pollution and Marine Debris, 2020). Dažniausiai jūrose ir vandenynuose aptinkami organiniai teršalai yra dažikliai, huminės medžiagos, fenoliniai junginiai, nafta, pesticidai, herbicidai ir vaistai (Chowdhury et al., 2016). Vieną iš pagrindinių organinių teršalų dalių sudaro organiniai junginiai, veikiantys kaip endokrininę sistemą ardančios medžiagos. Jie veikia ne tik vandens gyvūnų, bet ir žmogaus organizmus. Šio tipo teršalai per motinos organizmą persiduoda ir negimusiam vaisiui (Sormo et al., 2003). Kai kurie iš teršalų sukeltų padarinių yra neurodegeneraciniai sutrikimai, jie taip pat sukelia lytines sveikatos problemas, nes imituoja reprodukcinį hormonų poveikį (Ojha ir Tiwary, 2021).

Jūrinę aplinką sudaro vandenynai ir sūrios jūros (Aquatic Biome, 2023). Viena iš jūrų – Baltijos jūra – viena labiausiai užterštų jūrų pasaulyje (State of the Baltic Sea, 2023). Baltijos jūra teršiama eutrofikacija (azotu ir fosforu), metalais (švinu, kadmiu ir gyvsidabriu) ir organiniais teršalais (pavyzdžiui, chlororganiniais pesticidais (COP) ir policikliniais aromatiniiais angliavandeniliais). Šie teršalai blogina vandens kokybę, daro poveikį vandens organizmams, gyvūnams ir gali patekti į žmonių mitybos grandinę (Rana et al., 2022). Vienas geriausių indikatorių atskleidžiantis Baltijos jūros užterštumą yra jūros žinduoliai. Per pastarąjį šimtmetį Baltijos jūros ekosistema smarkiai pasikeitė dėl antropogeninio cheminio streso, kurį sukėlė POP. Šie teršalai veikia visas mitybos grandinės dalis pradedant nuo jūrų planktono, žuvų ir baigiant didžiausiais Baltijos jūros žinduoliais – pilkaisiais ruoniais (3 pav). Pavyzdžiui prie Norvegijos krantų sugautose žuvyse vegėlėse (lot. *Lota lota*) buvo pastebėta, kad POP trikdo estradiolio ir kortizolio sintezę (Zimmer et al., 2011).



3 pav. Teršalų padariniai jūrų maisto grandinėse (Organic Pollutants, World Ocean Review, 2023).

Baltijos jūros ruoniams dėl užterštumo dažniausiai pasitaikančios ligos yra antinksčių hiperplazija ir sumažėjęs kaulų tankis. Šie sutrikimai rodo padidėjusią kortizolio gamybą dėl ekstremalaus fiziologinio streso, kurį patiria gyvūnai. 1998 m. ruoniuose aptikta padidėjusi polichlorintų bifenilų (PCB) ir p,p'-DDT (dichlorodifeniltrichloretano) koncentracija. 1970 metais PCB buvo įtrauktas į draudžiamų naudoti chemikalų sąrašus ir šiuo metu šios medžiagos kiekis vandenyje sumažėjęs apie 55 – 85%, bet padariniai vis dar pastebimi jūrų gyvūnų organizmuose (Troisi et al., 2020, Tomza-Marciniak et al., 2019). Minėtos cheminės medžiagos buvo įvardytos kaip galinčios sukelti endokrininius sutrikimus panašias į Kušingo ligą, taip pat pastebėta, kad šios medžiagos gali sukelti daugybinius lėtinius organų sutrikimus, imunosupresiją ir storosios žarnos pakitimus. Išskirtinai ruonių patelėms cheminės medžiagos paskatina gimdos navikų susidarymą (Sonne et al., 2022). Taigi, jūroje esantys teršalai gali padaryti didelę įtaką jūrinių žinduolių hormonams.

1.4 Hormonai besivystančiuose ruoniuose

Kaip jau minėta anksčiau, vienas pavojingiausių POP poveikių jūros gyvūnams yra endokrininės sistemos trikdymas. Nustatyta, kad POP ir steroidiniai hormonai struktūriškai yra panašūs, todėl jie gali sąveikauti su hormonų transportiniais baltymais. Teršalai gali imituoti endokrininį poveikį gyvūnų organizmuose (Zimmer et al., 2011; Hoydal et al., 2017). Tyrinėjant banginius pastebėta, kad POP gali sutrikdyti ir reprodukcines sistemos hormonus, taip paveikiant reprodukcines funkcijas. Žinoma, kad organiniai teršalai gali turėti estrogeninį arba antiestrogeninį poveikį, pavyzdžiui PCB trukdo fermentams, dalyvaujantiems 17β -estradiolio metabolizme (Noël et al., 2017). Tyrimai atlikti su nėščiomis patelėmis atskleidė, kad besivystantis vaisius yra išskirtinai jautrus endokrininės sistemos sutrikimams. Dideli COP koncentracijos kiekiai aplinkoje neigiamai veikia gimdoje esantį vaisių ir žindymo laikotarpiu gali turėti įtakos reprodukcinėms funkcijoms (Hoydal et al., 2017). Tyrimuose

atliktuose su ruonių jaunikliais pastebėta, kad PCB veikia biologiniai kintamieji tokie kaip amžius lytis ir kūno būklė, kuri dažniausiai vertinama pagal kūno svorį ar riebalinio audinio kiekį – liesesni jaunikliai gali būti labiau paveikti, nes badavimo metu iš riebalų mobilizuojami PCB teršalai ir patenka į kraują. PCB ir susijusių junginių kiekis su amžiumi paprastai didėja abiejų lyčių nesubrendusiems individams ir suaugusiems patinams (Ross et al., 2000). Suaugusiose patelėse koncentracija pradeda mažėti, kai jos pasiekia lytinę brandą. Lytiškai subrendusios patelės riebaluose tirpius PCB perduoda jaunikliams žindymo metu (Noël et al., 2017). Taigi galima teigti, kad teršalai druskinguose vandens telkiniuose, ypač Baltijos jūroje, gali turėti didelę įtaką reprodukciniams, imunologiniams ir nerviniams gyvūnų sistemoms.

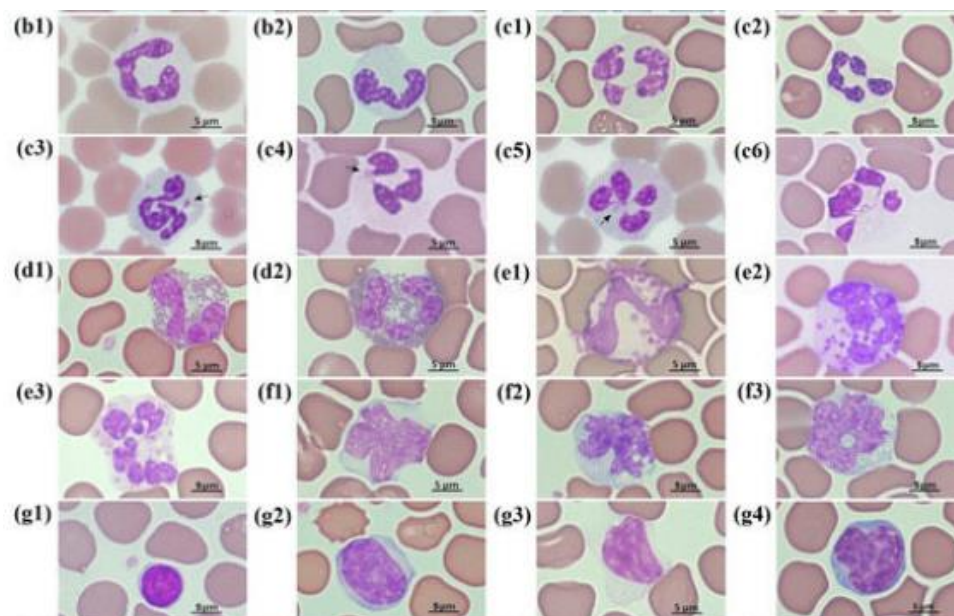
1.5 Ruonių jauniklių hematologija

Pilkieji ruoniai (*lot. Halichoerus grypus*) ankstyvoje raidos stadijoje patiria reikšmingus hematologinius pokyčius, ypač po atjunkymo pasninko (*angl. post-weaning fast, PWF*) laikotarpiu. PWF trunka vidutiniškai 21 dieną, tačiau gali svyruoti nuo 9 iki daugiau nei 31 dienos. Jo metu pilkųjų ruonių jauniklių hematologiniai parametrai ženkliai didėja: hemoglobino lygis padidėja 28%, hematokrito – 21%, o masės vienetui tenkantis kraujo tūris – 13% (Noren ir kt., 2005).

Pilkieji ruonių jaunikliai ankstyvoje raidoje taip pat pasižymi žymiais leukocitų skaičiaus ir imuninės sistemos pokyčiais. Tyrimai rodo, kad limfocitų funkcionalumas ir bendras imunoglobulino G (IgG) lygis naujagimiams yra žemas, tačiau iki laktacijos pabaigos šie rodikliai padidėja (Ross ir kt., 1993). Tai rodo, kad naujagimių imuninė sistema dar nėra visiškai išsivysčiusi, todėl jie gali būti labiau pažeidžiami infekcijoms. Ruonių motinų imuninė funkcija laktacijos metu mažėja – pastebimas sumažėjęs limfocitų funkcionalumas ir bendras IgG lygis laktacijos pabaigoje (Ross ir kt., 1993). Tai kontrastuoja su gerėjančia jauniklių imunine funkcija ir pabrėžia skirtingus fiziologinius iššūkius, su kuriais susiduria motinos ir jaunikliai šiuo kritiniu laikotarpiu.

Ruonių kraujyje pagrindiniai leukocitai dalyvaujantys imuninėse reakcijose yra: limfocitai, kurie atsakingi už įgytą imunitetą, naujagimiai jų turi mažiau, tačiau jų skaičius didėja su amžiumi, ypač iki laktacijos pabaigos. Neutrofilai, jie yra pagrindinės fagocituojančios ląstelės kovojančios su bakterinėmis infekcijomis. Neutrofilai aujagimiuose yra pagrindinis leukocitų tipas, tačiau jų skaičius mažėja su amžiumi. Eozinofilai, dalyvauja kovojant su parazitinėmis infekcijomis ir alerginėmis reakcijomis, jų kiekis dažnai gali padidėti esant aukštesnei temperatūrai. Monocitai, yra didelės fagocituojančios ląstelės, kurios diferencijuojasi į makrofagus audiniuose, jų kiekis priklausomas nuo temperatūros, jai kylant – monocitų skaičius kraujyje gali sumažėti. Bazofilai, rečiausiai pasitaikantys leukocitai. Jie

dalyvauja alerginėse reakcijose ir uždegiminiuose procesuose, nors specifinių duomenų apie jų kiekį pilkųjų ruonių kraujyje trūksta, jų buvimas yra svarbus imuninio atsako komponentas (4 pav.) (Poulin, et al., 1994).



4 pav. Ruonių baltosios kraujo ląstelės. (b1,b2) juostos neutrofilai; (c1) segmentuotas neutrofilas su 3 branduolio skiltelėmis, nuosekliai sujungtomis plonais nukleoplazmos siūlais; (c2) hipersegmentuotas neutrofilas su 5 branduolio skiltelėmis, sujungtomis nuosekliais plonais branduolio siūlais; (c3) segmentuotas neutrofilas su Barr korpusu (rodyklė); (c4) segmentuotas neutrofilas su 3 branduolio skiltelėmis, sujungtomis nuosekliais plonais branduolio siūlais ir branduolio pūslelių priedais (pūslėmis) (rodyklė); (c5) segmentuotas neutrofilas su 4 branduolio skiltelėmis, sujungtomis plonomis branduolio gijomis iš centrinio taško ir branduolio pūslelių priedų (dėmių) (rodyklė); (c6) hipersegmentuotas neutrofilas su 5 branduolio skiltelėmis, sujungtomis plonomis branduolio gijomis; (d1,d2) eozinofilai; (e1–e3) bazofilai; (f1–f3) kintamos morfologijos monocitai; (g1) mažas limfocitas; (g2) didelis limfocitas; (g3) didelis limfocitas; (g4) reaktyvus (aktyvuotas limfocitas), (Esipova, Polina, et al., 2025)

Šie hematologiniai rodikliai rodo, kad pilkųjų ruonių jauniklių imuninė sistema yra dinamiška ir prisitaikanti prie aplinkos sąlygų bei vystymosi etapų.

Deguois ruonių kraujyje:

Dar vienas parametras, kuris keičiasi ruonių jaunikliams bręstant yra deguonies kiekis kraujyje. jaunikliai badavimo laikotarpiu turi išmokti gyvybiškai svarbių funkcijų, tokių kaip maitintis ar nardyti, dėl to ruonių kraujyje ir raumenyse turi susiformuoti tam tikri kiekiai deguonies, kurie bręstant ir nardant vis daugiau kinta. Šis fiziologinis prisitaikymas yra būtinas siekiant užtikrinti išgyvenimą jūrinėje

aplinkoje, kurioje jaunikliai tampa vis labiau priklausomi nuo savo nardymo gebėjimų. Hb ir Hct yra vieni iš pagrindinių parametrų atskleidžiantys organizmo sugebėjimą pernešti deguonį. Hct (hematokritas) ir Hb (hemoglobinas) – tai geležį turintis baltymas eritrocituose, atsakingas už deguonies pernašą iš plaučių į audinius. Tuo tarpu hematokritas parodo, kokią kraujo tūrio dalį sudaro eritrocitai – tai netiesioginis rodiklis, apibūdinantis kraujo „tankį“ bei deguonies pernašos potencialą. Dėl hematologinių pokyčių bendras kūno masės vienetui tenkantis deguonies kiekis padidėja 35%, o apskaičiuotas aerobinis nėrimo limitas (CADL) – 23%. Hb ir Hct lygiai PWF pabaigoje beveik prilygsta vienerių metų ruonio rodikliams, tačiau bendras kūno masės vienetui tenkantis deguonies kiekis ir CADL pas ką tik nepriklausomais tapusius jauniklius išlieka tik 66–67% ir 32–62% (Noren et. al., 2005). Tai rodo, kad nors PWF yra labai svarbus nardymo fiziologijos vystymuisi, ką tik savarankiškai tapę jaunikliai vis dar turi ribotas nardymo galimybes, palyginti su vyresniais ruoniais.

1.5 Estradiolio ir baltųjų kraujo kūnelių sąveika

Estradiolis, kaip vienas pagrindinių moteriškųjų lytinių hormonų, atlieka svarbų vaidmenį ne tik reprodukciniuose procesuose, bet ir imuninio atsako reguliacijoje (Straub, 2007). Šis hormonas dalyvaudamas imunologiniuose procesuose veikia įvairias leukocitų grupes: jis stimuliuoja limfocitų proliferaciją, skatina B ląstelių diferenciaciją bei citokinų sekreciją (Kovats, 2015). Taip pat žinoma, kad estradiolis gali paveikti neutrofilų migraciją, sumažinti makrofagų fagocitinį aktyvumą ir moduluoti eozinofilų bei bazofilų aktyvumą, prisidedamas prie uždegiminių procesų reguliacijos (Kovats, 2015; Cutolo et al., 2004). Tokie hormoniniai – imuniniai ryšiai ypač svarbūs gyvūnų vystymosi laikotarpiu, kai hormonų koncentracijos svyruoja intensyviai, o organizmas tuo metu formuoja ilgalaikes fiziologines funkcijas, įskaitant gebėjimą efektyviai reaguoti į infekcijas, stresą ar aplinkos iššūkius. Vis dėlto estradiolio sąveika su limfocitais jūriniuose žinduoliuose ypač pilkuosiuose ruoniuose vis dar išlieka neaiški, dėl to buvo atliktas tyrimas pateiktas šiame darbe.

2. Medžiagos ir metodai

Tyrimui reikalingi pilkųjų ruonių mėginiai rinkti 2024 - 2025 metų kovo mėnesiais, Estijoje. Viso surinkta 50 mėginių (2024m. – 20 mėginių, 2025m. – 30 mėginių) iš 4 vietovių: Alirahu, Kerju, Vestikumaa ir Innarahu, Mėginiai rinkti šviesiu paros metu tarp 11 ir 17 valandos, vidutiniškai $\sim 14 \pm 0,04$ val.

Mėginio rinkimo metu buvo vertinamas bendras procedūros laikas, kuris pradedamas skaičiuoti, kai pagaunamas individas, o baigiasi – jį grąžinus į paėmimo vietą. Vidutinė procedūros trukmė – $14 \pm 0,04$ min (mažiausiai 8min., daugiausiai 32min.). Vidutinė kraujo ėmimo trukmė 2:26 (ilgiausia trukusi procedūra – 5:20, o trumpiausia – 1:19). Taip pat atskirai buvo vertinamas laikas tarp pagavimo ir kraujo mėginio paėmimo – vidutiniškai 3 min. (mažiausiai – trumpiau nei minutė, ilgiausiai – 15 min.) tam, kad įvertinti streso poveikį ir jo galimą įtaką kortizolio koncentracijai. Svarbu pabrėžti, kad vertinant streso poveikį nustatyta, jog kortizolis reikšmingai pakyla tarp 3 ir 4 minutes (Knezevic, 2023).

Kraujo mėginiai buvo imami iš ekstraduralinės (nugarinės) venos į 6-10 ml etilendiamintetraacto rūgšties (EDTA) vakutainerius (Vacutest kima, Italija). Po surinkimo mėginiai buvo centrifuguojami (ORILAO, Kinija) 2100 aps/min. (700 g jėga) 10 min., o gauta plazma išpilstyta į 500 μ L mėgintuvėlius (Ependorf, Vokietija). Mėginiai iš pradžių 2 dienas buvo laikomi -20°C temperatūroje, vėliau perkelti į -80°C temperatūrą, kol bus atliekami tolesni mėginių paruošimo ir analizės darbai.

Mėginių rinkimo metu buvo renkami ir morfometriniai gyvūno parametrai (svoris, ilgis ir krūtinės apimtis). Šiame tyrime iš morfometrinių parametrų pasirinktas naudoti tik svoris, nes jis tiksliausiai atspindi jauniklio vystymosi pokyčius. Mėginiai buvo imami iš išoriškai sveikų jauniklių. Badaujantys ar sužaloti jaunikliai nebuvo tiriami, kad nesukelti papildomo streso ir pavojaus gyvybei. Atlikus visas procedūras ruoniukai buvo nufotografuoti, pažymėti spalviniais vaškiniais žymekliais (5 pav.) ir paleisti.

Procedūros buvo atliekamos laikantis visų saugumo reikalavimų. Mėginių ėmimui išduoti leidimai (Estijos aplinkos ministerijos išduoti leidimai nr. 1-3/25/44, 2025-03-07; nr 1-3/20/60, 2020-01-24). Mėginius rinko Felasa C lygį atitinkantį pažymėjimą turintis asmuo.



5 pav. Ekspedicijos metu tirtas ruonis (vyriškos lyties).

Visi imti mėginiai ir procedūrų laikas, gyvūno lytis, jauniklio stadija, gyvūno išmatavimai, jauniklio identifikacinis numeris, pažymėta ar jauniklis atjunktas (*weaner*), neatjunktas (*pup*) užfiksuota (Pateikta priede Nr. 1).

Pilkojo ruonio jauniklio stadijos nustatymas. Pagavus ruoniuką yra nustatoma jo **mitybinė stadija**: žindomas jauniklis (*angl. pup*) ar atjunktas (*angl. weaner*) jauniklis. Kai kuriais atvejais nustatyti yra sudėtinga, tad nustatymui gali būti naudojami tolimesni stebėjimai, kraujo vizualinis įvertinimas (maitinamų jauniklių kraujyje galima stebėti daugiau lipoproteinų).

Vėliau nustatoma vystymosi stadija, kuri nusako apytykslį jauniklio amžių (6 pav. ir 1 lentelė):

- **1 stadija** – matoma po gimdymo likusi virkštelė, kailis yra gelsvai rusvos spalvos, matomi kraujo pėdsakai, kaklas gerai išreikštas – šiame darbe tik gimę jaunikliai nebuvo tirti.
- **2 stadija** – virkštelė matoma, bet yra šiek tiek apdžiūvusi, kailis panašios spalvos kaip ir pirmoje stadijoje, kūnas dar raukšlėtas, matomas kaklas – maždaug 1-2 dienų amžiaus jauniklis.
- **3 stadija** – virkštelės nėra, kailis baltos spalvos, nesipeša, kaklas neišsiskiria, kūnas ovalios spalvos, raukšlių nematyti – maždaug 3-10 dienų amžiaus jauniklis.
- **4 stadija** – kailis lengvai atsiskiria, matomas tikrasis pilkas kailis, kaklo nesimato, kūnas apvalus-ovalus, didelė kūno masė – maždaug 11-18 dienų amžiaus jauniklis.
- **5 stadija** – visiškai nusišėręs jauniklis, nebeturi balto lanugo kailio. Kūno masė gali varijuoti priklausomai nuo badavimo po atjunkymo trukmės – daugiau nei 19-21 dienos amžiaus.



Pav. 6. Ruonių stadijų skirtumai. 1 savaitė (stadija 1), savaitė 2 (stadija 2) nuo 3 savaitės (stadijos 3-5) (Sayer ir Witt, 2018)

2.1 Estradiolio tyrimas ELISA metodu

Hormono 17β -estradiolio (E2) analizė buvo atliekama ELISA metodu iš kraujo plazmos naudojant komercinį ELISA (KB30-H) (Arbor Assay kit, JAV) – **Toliau Arbor kit** ir 17β -Estradiol ELISA (RE52041) Immunoassay Kit (Tecan, Vokietija)- **toliau Tecan rinkiniais**. Remiantis Vaidos Survilienės tyrimu (2022), Tecan (RE52041) ELISA rinkiniai buvo sėkmingai suvaliduoti naudojimui su ekstrahuotais ruonių kraujo plazmos mėginiais.

2.1.1 Estradiolio koncentracijos nustatymas Arbor kit rinkiniu

Šiame tyrime estradiolio koncentracija serume ar plazmoje buvo nustatoma naudojant DetectX® Serum 17β -Estradiol Enzyme Immunoassay Kit rinkinį, pagrįstą konkurenciniu fermentiniu imunoanalizės (ELISA) principu. Su rinkiniu buvo tirti 20 mėginių, pirmą kartą mėginius skiedžiant pagal gamintojo rekomendaciją t.y. **1:20**, gavus koncentracijas kurios buvo praktiškai neaptinkamos arba lygios 0, analizė kartota su tais pačiais 20 mėginiais, tik skiedimas **padidintas iki 1:4**. Naudota ELISA plokštelė 96 šulinėlių, į šulinėlius buvo įpipetuota po 100 μ L praskiesto mėginio ar standarto. Supilūs konjugatus ir antikūnus plokštelė supurtoma ir inkubuota kambario temperatūroje 2 valandas purtant (700–900 rpm). Po inkubacijos mėginiai išpilami ir plokštelė plaunama 4 kartus (BioTek, JAV), kiekvieną kartą naudojant 300 μ L plovimo buferį (Wash Buffer), po to plokštelė buvo nusausinta ant sugeriančio popieriaus. Toliau į kiekvieną šulinėlį buvo įpilta 100 μ L TMB substrato tirpalo, o plokštelė inkubuota 30 minučių kambario temperatūroje be purtymo.

Reakcija buvo sustabdoma užpilant 50 μ L Stop Solution (H_2SO_4). Optinis tankis (OD) buvo išmatuotas plokštelių skaitytuvu (BioTek, JAV), nustatytu 450 nm bangos ilgiui. Rinkinio detekcijos ribos (*angl. limit of detection, LOD*) riba yra 19,5 pg/mL. Visos reikšmės, kurios buvo žemiau LOD

yra skaičiuojamos pagal šią formulę $LOD/2=9,75 \text{ pg/mL}$. Nustatytas intra-analizės variacijos koeficientas, du pakartojimai toje pačioje lėkštelėje, (intra-assay CV) – 3,4 % ir inter-analizės variacijos koeficientas, du pakartojimai skirtingose lėkštelėse (inter-assay CV) – 3,57 %.

2.1.2 Estradiolio koncentracijos nustatymas su ekstrahuotais ir neekstrahuotais mėginiais naudojant Tecan kit rinkinį

Mėginių ekstrahavimas. Tecan rinkinys buvo validuotas ekstrahuotiems mėginiams ir siekėme palyginti ekstrahuotų ir neekstrahuotų mėginių reikšmes. Pirmiausia mėginiai buvo ekstrahuojami. Prie mėginio pridodamas dietileteris 5:1 (tūrio/tūrio), po to tirpalas intensyviai maišomas naudojant vorteksą (Vortex 2 S000, Vokietija) dvi minutes ir paliekamas penkioms minutėms, kad fazės atsiskirtų. Tada mėginys užšaldomas sausame lede (iki 2 min), o viršutinis tirpiklio sluoksnis perpilamas į švarų mėgintuvėlį stovinti laminarinėje spintoje (Waldner, Vokietija). Siekiant maksimalaus ekstrakcijos efektyvumo, šis procesas buvo pakartotas 3 kartus, sujungiant visus tirpiklio sluoksnius. Galiausiai pabaigus 3 pakartojimą, mėginiai su eteriu palikti garuoti 1,5 val arba kol mėginio mėgintuvėlyje liks ~2 mL. Mėginiams nugaravus, jie perkeliama į garinę centrifugą (Thermo Fisher, JAV) pilnam mėginio išdžiovinimui. Mėginiai pilnai išdžiovinami per 30–35 minutes. Mėginiai yra užpilami 125 µL Steroid free serum (Tecan, Vokietija) ir saugomi –20°C temperatūroje, užtikrinant sausą aplinką iki ELISA analizės pradžios.

Šiame tyrime 17β -estradiolio koncentracija buvo nustatyta naudojant 17β -Estradiol ELISA Tecan kit rinkinį, kuris pagrįstas konkurenciniu fermentiniu imunoanalizės (ELISA) principu. Į kiekvieną mikroplokštelės šulinėlį buvo įpilta 25 µL mėginio, standarto ar kontrolinio mėginio ir 100 µL fermento konjugato, plokštelė purtoma 10 sekundžių, o po to plokštelė inkubuojama 90 minučių kambario temperatūroje nepurtant. Po inkubacijos visas plokštelės turinys nupilamas ir plokštelė praplaunama 3 kartus (BioTek, JAV) su 400 µL praskiesto plovimo buferio, o vėliau į kiekvieną šulinėlį įpilama 100 µL tetrametilbenzidino (TMB) substrato ir inkubuota dar 30 minučių. Reakcija sustabdoma įpilant 50 µL STOP tirpalo (0,5 M sieros rūgšties), o optinis tankis (OD) buvo matuojamas esant 450 nm bangos ilgiui (BioTek, JAV), lyginant gautas reikšmes su standartinė kreive estradiolio koncentracijai apskaičiuoti. Rinkinio detekcijos ribos LOD riba yra 9,8 pg/mL. Visos reikšmės, kurios buvo žemiau LOD yra skaičiuojamos pagal šią formulę $LOD/2=4,9 \text{ pg/mL}$. Nustatyta, kad analizės pakartojamumas buvo geras: intra-analizės variacijos koeficientas (du pakartojimai toje pačioje lėkštelėje) (CV) sudarė 5,11 %, o inter-analizės variacijos koeficientas (du pakartojimai skirtingose lėkštelėse) – 3,22 %.

2.2 Kraujo morfologinė analizė

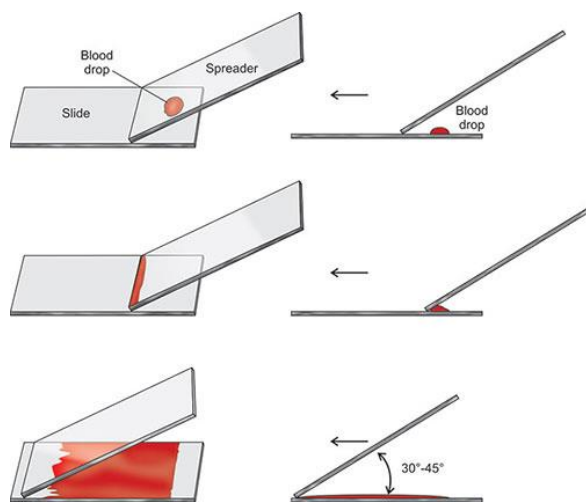
2.2.1 Baltųjų kraujo ląstelių analizė

Bendras baltųjų kraujo ląstelių (WBC) skaičius nustatytas dviem būdais – rankiniu būdu bei analizatoriaus pagalba.

2.2.1.1 WBC skaičiavimas rankiniu būdu

Bendram leukocitų (M_WBC) skaičiui nustatyti buvo naudojamas Neubauerio hemocitometras (Thermo fisher scientific, JAV). Tiriamasis kraujo mėginys buvo praskiedžiamas 1:10 (10 ul kraujo ir 100 ul dažo) t.y. viena kraujo ir 10 Baar tirpalo (formalinas – 1ml, Japonin BDH – 0,25 g., Natrio citratas – 3,5 g., Brilliant Cresyl Blue dažas – 0,1 g., distiliuotas vanduo – iki 100ml.). Vėliau 10 µL mišinio skysčio buvo įlašinama į Neunberio skaičiavimo kamerą. Ląstelės buvo suskaičiuotos visuose tinklelio kvadratuose, naudojantis šviesiniu mikroskopu (Carl Zeiss, Vokietija). Mėginys skaičiuotas du kartus ir galutiniam vertinimui išvestas vidurkis. Jei skirtumas tarp dviejų skaičiavimų viršydavo 20%, skaičiavimai būdavo pakartojami iš naujo su naujais mėginiais.

Kraujo tepinėlio paruošimas. Diferenciniam baltųjų kraujo ląstelių nustatymui naudotas kraujo tepinėlis SMEARS. Tepinėlio paruošti 10 µl kapiliarinio kraujo buvo užlašinama ant švaraus objektinio stiklelio. Naudojant kitą stiklėlį, jį laikant 30° – 45° kampu, kraujas tolygiai išliejamas plonu sluoksniu. Tepinėlis paliekamas išdžiūti kambario temperatūroje (Kerr, 1989). (Pav. 7). Kiekvienam individui paruošti 3 SMEARS tepinėliai.



Pav. 7. SMERS tepinėlio paruošimo metodika (Marwaha, Komal., 2010)

Ląstelių diferencinis skaičiavimas. Dažymo procedūra atlikta remiantis Armstrong et al., 2019 metodika. Pirmiausia ant tepinėlio buvo užlašinama 500 µl jau paruošto Leischman dažo (Merck,

Vokietija) ir palaikoma 2 minutes, kad ląstelės būtų fiksuotos ir pradėtų gerti dažą. Vėliau dažas skiedžiamas 500 µl vandens ir tepinėlis praskiestame dažė buvo laikomas dar 10 minučių galutiniam dažo sugėrimui. Pasibaigus laikui, tepinėlis švelniai nuplaunamas distiliuotu vandeniu ir paliekamas išdžiūti (Armstrong et. al., 2019).

Paruoštas tepinėlis mikroskopuojamas naudojant 40x objektyvą (bendras didinimas – 400x), išsirenkant 10 skirtingų matymo laukų. Skaičiuojant WBC detaliai įvertinama kraujo ląstelių morfologija, įskaitant neutrofilus, eozinofilus, bazofilus, limfocitus ir monocitus. Suskaičiavus ląsteles visuose laukuose ląstelių skaičius iš kiekvieno lauko yra sudedamas ir padalinamas iš 10, taip gaunamas vidutinis leukocitų kiekis matymo lauke. Kiekybiniam diferencijuotų leukocitų kiekio nustatymui naudotas vidutinis kiekvieno tipo ląstelių skaičius. buvo padalintas iš vidutinio WBC skaičiaus ir šis santykis padaugintas iš kiekybiškai apskaičiuoto **M_WBC**, taip gaunant galutinę kiekybinę kiekvieno ląstelių tipo koncentraciją, išreikštą sk.*10⁹/L.

$$X = \frac{x \text{ ląst. sk.}}{\text{bendras suskaičiuotų ląst. sk.}} \times M_WBC$$

Analizėje buvo pasirinkti tik **M_WBC** grupės duomenys. Šios grupės mėginiai buvo analizuoti iškart po surinkimo, todėl laikoma, kad jie tiksliau atspindi tikrąją kraujo ląstelių sudėtį, palyginti su vėliau apdorotais mėginiais, kuriuose galėjo atsirasti papildomų ląstelių šiukšlių ir iškraipytų rodmenų.

2.2.2.2 WBC skaičiavimas analizatoriumi

Taip pat kraujo sudėtis tirta analizatoriumi (Exigo eos vet, Švedija). Krauju pripildžius kapiliarą jis įdedamas į analizatorių ir gaunami duomenys apie bendrą baltųjų kraujo kūnelių skaičių (10⁹/L) (**A_WBC**). Limfocitų (10⁹/L), monocitų (10⁹/L) ir granulocitų (10⁹/L) kiekį litre kraujo. Taip pat analizatorius pateikia hemoglobino (g/dl), hematokrito (%), raudonųjų kraujo kūnelių skaičių (10¹²/L) .

2.2.3 Statistinė analizė

Statistinė duomenų analizė buvo atlikta naudojant MC Excel (Microsoft Office, 2024) ir SPSS versija 30 (IBM Corp., 2013) programinę įrangą. Prieš atliekant hipotezių tikrinimą, buvo įvertintas duomenų normalumas, naudojant Shapiro–Wilk ir Kolmogorov–Smirnov testus, taip pat vizualiai – per histogramas bei Q–Q grafikus. Normalumo kriterijus atitiko kūno svorio duomenys o netitiko estradiolio koncentracijos, kraujo mėginių duomenys. Papildomai buvo analizuoti Skewness ir Kurtosis rodikliai.

Duomenims, kurie atitiko normalumo prielaidas, buvo taikytos parametrinės analizės: Vienfaktorė ANOVA ir Dviejų veiksnių ANOVA (Univariate GLM) skaičiuotas vidurkis. Duomenims,

kurie neatitiko normalumo naudojant buvo skaičiuojama mediana (min/max). Skirtumui tarp dviejų nepriklausomų grupių vertinti taikytas Mann–Whitney U testas (MW), o skirtumams tarp trijų ir daugiau nepriklausomų grupių vertinti naudotas Kruskal-Wallis testas (KW). Ryšiui tarp dviejų ir daugiau kintamųjų taikyta Spearman koreliacija. Statistiškai reikšmingais laikyti rezultatai, kurių $p \leq 0,05$.

3. Rezultatai

3.1 Estradiolio analizė

3.1.1 Estradiolio Elisa rinkinių palyginimas tarpusavyje

Atlikus Spearman koreliacijos analizę, stipriausia teigiama koreliacija nustatyta tarp Arbor kit (1:20) ir Arbor kit (1:4) metodų ($r = 0,847$; $p < 0,001$). Tekan kit ekstrahuotų mėginių ir neekstrahuotų mėginių vidutinio stiprumo statistiškai reikšminga koreliacija ($r = 0,419$; $p = 0,003$). Tarp Tecan ir Arbor kit rinkinių statistinio reikšmingumo nerasta (2 lentelė).

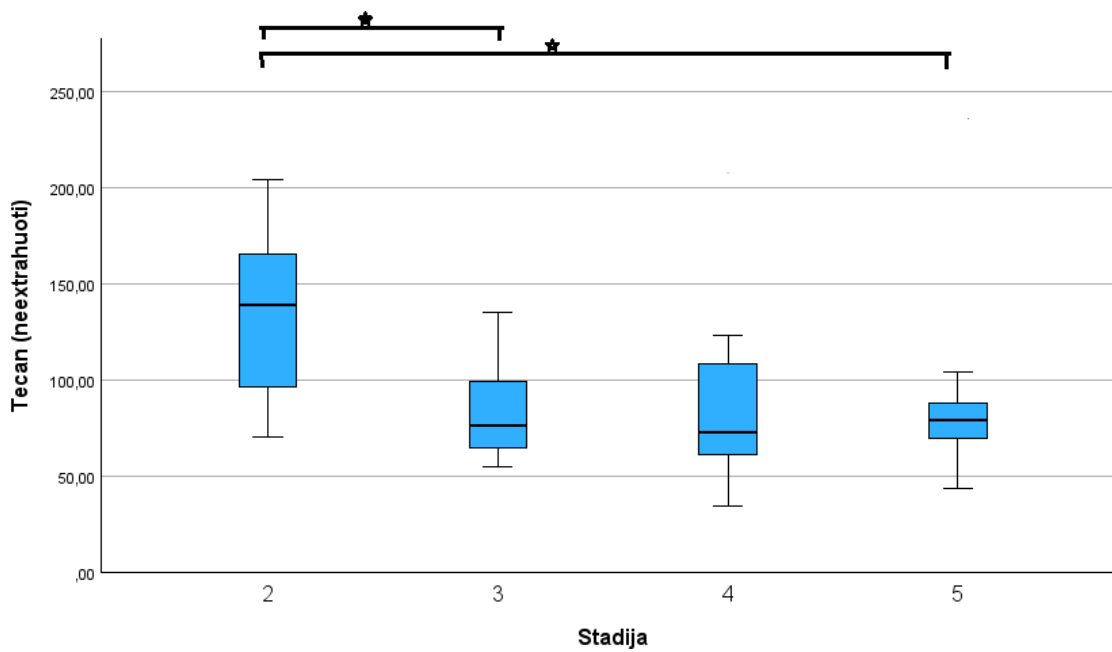
Lentelė nr. 2. ELISA rinkinių, skirtų estradiolio koncentracijai nustatyti koreliacija tarpusavyje.

	Neekstrahuoti mėg.	ekstrahuoti mėg.	Arbor kit (1:20)	Arbor kit (1:4)
Neekstrahuoti mėg.	1	$r=0,419$ $p=0,003$	$r=-0,333$ $p=0,152$	$r=-0,374$ $p=0,105$
ekstrahuoti mėg.	$r=0,419$ $p=0,003$	1	$r=0,474$ $p=0,474$	$r=0,263$ $p=0,263$
Arbor kit (1:20)	$r=-0,333$ $p=0,152$	$r=0,474$ $p=0,474$	1	$r=0,847$ $p<0,001$
Arbor kit (1:4)	$r=-0,374$ $p=0,105$	$r=0,263$ $p=0,263$	$r=0,847$ $p<0,001$	1

Tarp estradiolio koncentracijų, nustatytų naudojant skirtingus mėginių apdorojimo metodus (neekstrahuotus, ekstrahuotus ir Arbor Assay rinkinį), nustatytos nuoseklios, vidutinio stiprumo koreliacijos, rodančios, kad matavimo rezultatai yra tarpusavyje susiję, nepaisant metodo variacijos.

3.1.2. Estradiolio priklausomybė nuo skirtingų veiksmų

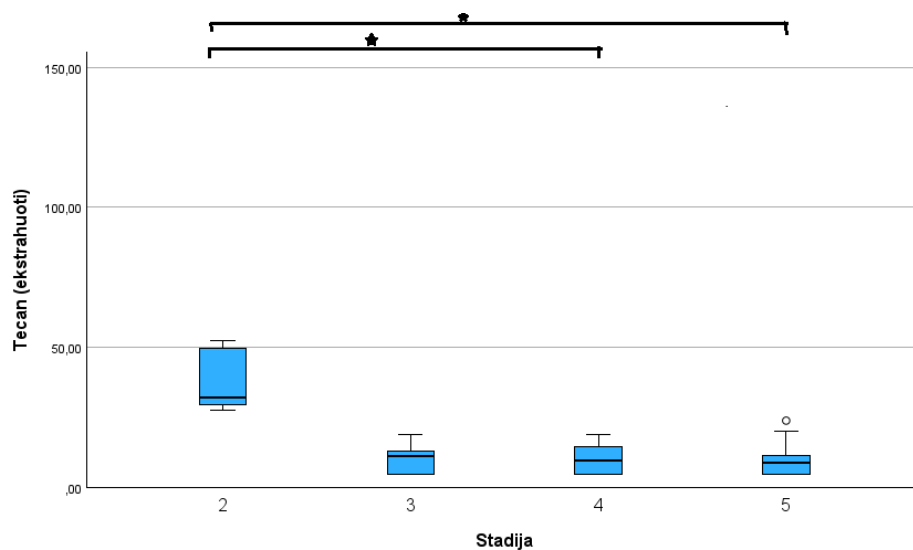
Neekstrahuotų (Tecan) rinkinių neparametrinė analizė (KW) parodė, kad estradiolio koncentracijos skyrėsi statistiškai tarp 2 – 3 stadijos ($H(3) = 3,088$, $p = 0,043$) ir tarp 2 – 5 stadijų ($H(3) = 3,088$, $p = 0,033$) (8 pav.). Stadijoje 2 buvo nustatytas aukščiausias hormono kiekis, kuris buvo mažesnis 3, 4 ir 5 stadijose. Šie rezultatai leidžia teigti, kad vystymosi progresavimas susijęs su sumažėjusiu estradiolio lygiu.



8 pav. Tecan (neekstrahuoto) mėginio koncentracijų pasiskirstymas skirtingose vystymosi stadijose (N= 50).

Neekstrahuotų mėginių analizės Tecan rinkiniu parodė, kad estradiolio koncentracijos reikšmingai mažėjo su vystymosi stadija – aukščiausios reikšmės stebėtos 2 stadijoje, o vėlesnėse stadijose reikšmingai sumažėjo ($p < 0,05$).

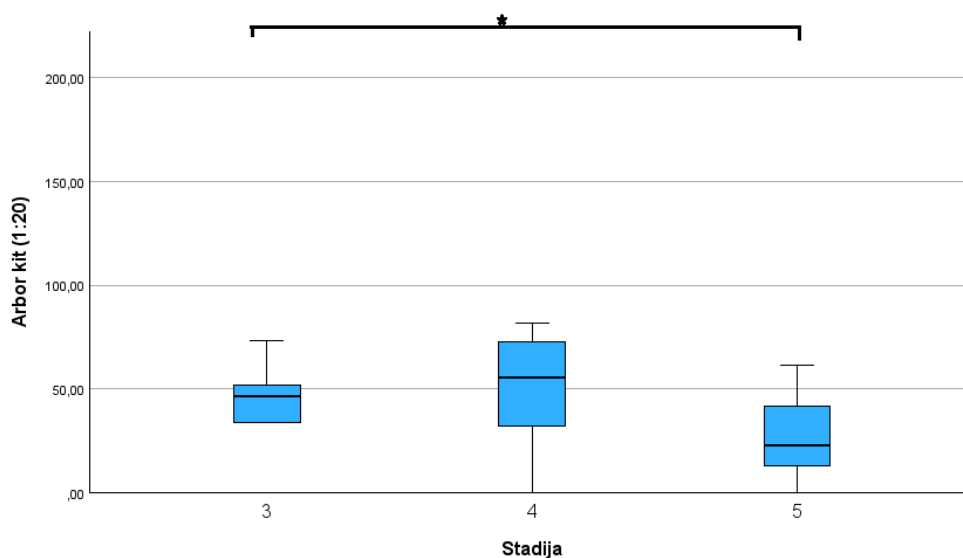
Tarp **ekstrahuotų (Tecan)** mėginių statistiškai reikšmingi skirtumai nustatyti tarp 4 – 2 ($H(3) = 5,405, p = 0,043$), ir 5 – 2 ($H(3) = 5,405, p = 0,009$) stadijų (9 pav.). Stadijoje 2 buvo fiksuota aukščiausia hormono koncentracija, kuri sumažėjo 3 ir 4 stadijose. Šie rezultatai rodo, kad hormono lygis mažėja progresuojant vystymosi stadijoms, kas gali atspindėti fiziologinius ar endokrininius pokyčius. Patinėlių grupėje statistiško reikšmingumo nenustatyta.



9 pav. Tecan (ekstrahuoto) mėginio koncentracijų pasiskirstymas skirtingose vystymosi stadijose (N= 50).

Ekstrahuotų mėginių analizės Tecan rinkiniu parodė, kad estradiolio koncentracijos reikšmingai mažėjo su vystymosi stadija – aukščiausios reikšmės stebėtos 2 stadijoje, o vėlesnėse stadijose reikšmingai sumažėjo ($p < 0,05$).

Tarp Arbor 1:20 kit rinkinių neparametrinė KW analizė parodė, kad tarp 5 ir 3 vystymosi stadijų buvo nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas ($(H(3) = 3,486, p = 0,05)$), kitose stadijose statistiškai reikšmingų sąsajų nenustatyta (10 pav.).



10 pav. Arbor kit (1:20) rinkinio koncentracijų pasiskirstymas skirtingose vystymosi stadijose (N= 20).

Paveiksle nepavaizduota 2 stadija, kadangi su šiais Arbor kit rinkiniais nebuvo analizuoti mėginiai, surinkti iš antros vystymosi stadijos gyvūnų.

Arbor 1:4 kit rinkinių neparametrinė KW analizė parodė, kad estradiolio koncentracijos statistiškai reikšmingai nesiskyrė tarp stadijų ($H(3) = 2,584$, $p > 0,05$).

Skirtumai tarp lyčių. Atlikus Mann–Whitney U testą, skirtumai tarp patinų ir patelių **Tecan (neekstrahuoti)** estradiolio koncentracijose nebuvo statistiškai reikšmingi ($U = 265,000$; $Z = -0,922$; $p = 0,357$). Taip pat ir, **Tecan (ekstrahuoti)** mėginiuose skirtumas nebuvo reikšmingas ($U = 271,000$; $p = 0,411$). Arbor kit rinkiniuose Taip pat nebuvo nustatyta reikšmingų, su lytimi susijusių, skirtumų estradiolio koncentracijose: **Arbor kit (1:20)** ($U = 39,000$; $p = 0,405$) ir **Arbor kit (1:4)** ($U = 35,500$; $p = 0,256$). Šie rezultatai rodo, kad **estradiolio koncentracijos nesiskyrė tarp lyčių**, nepriklausomai nuo naudojamo mėginio tipo ar skiedimo metodo.

Skirtumai tarp mitybinės stadijos. Mann–Whitney U testas parodė, kad Tecan (**neekstrahuoti**) estradiolio koncentracijos nesiskyrė tarp pup ir weaner jauniklių grupių ($U = 309,000$; $Z = -0,029$; $p = 0,977$). Taip pat nenustatyta reikšmingų skirtumų ir Tecan (**ekstrahuoti**) mėginių grupėje ($U = 255,000$; $p = 0,270$). Vertinant estradiolio koncentracijas **su Arbor kit (1:20)**, fiksuota tendencija rodanti didesnes estradiolio koncentracijas Pup grupėje, palyginti su atjunkytais jaunikliais (Weaner), naudojant 1:20 skiedimo santykį ($U = 27,000$; $Z = -1,623$), tačiau rezultatas išliko statistiškai nereikšmingas ($p = 0,105$). Taip pat **Arbor kit (1:4)** rezultatai neparodė reikšmingo skirtumo tarp pup ir weaner jauniklių ($U = 32,000$; $p = 0,200$). Apibendrinant, visais atvejais **estradiolio kiekis nesiskyrė tarp vystymosi stadijų**, nepriklausomai nuo mėginio tipo ar skiedimo santykio.

Koreliacija tarp kūno masės ir rinkinių. Spearman koreliacijos analizė parodė, kad kūno masė silpnai neigiamai koreliavo su visais estradiolio matavimo būdais, tačiau šios koreliacijos nebuvo statistiškai reikšmingos ($p > 0,05$) (3 lentelė). Koreliacija tarp rinkinių apžvelgta 4 lentelėje.

Lentelė nr. 3. Koreliacija tarp kūno masės ir naudotų ELISA rinkinių. Tecan (ekstrahuoti) (N=50), Tecan (neekstrahuoti) (N=50), Arbor kit (1:20) (N=20) ir Arbor kit (1:4) (N=20).

	Tecan (ekstrahuoti)	Tecan (neekstrahuoti)	Arbor kit (1:20)	Arbor kit (1:4)
Kūno masė	r= -0,246 p= 0,084	r= -0,230 p= 0,108	r= -0,303 p= 0,195	r= -0,289 p= 0,217

Tarp Tecan rinkiniu ekstrahuotų ir neekstrahuotų lyginant su kūno mase visi tyrimo metodai koreliavo silpnai ir nereikšmingai.

3.2 Baltųjų kraujo ląstelių analizė

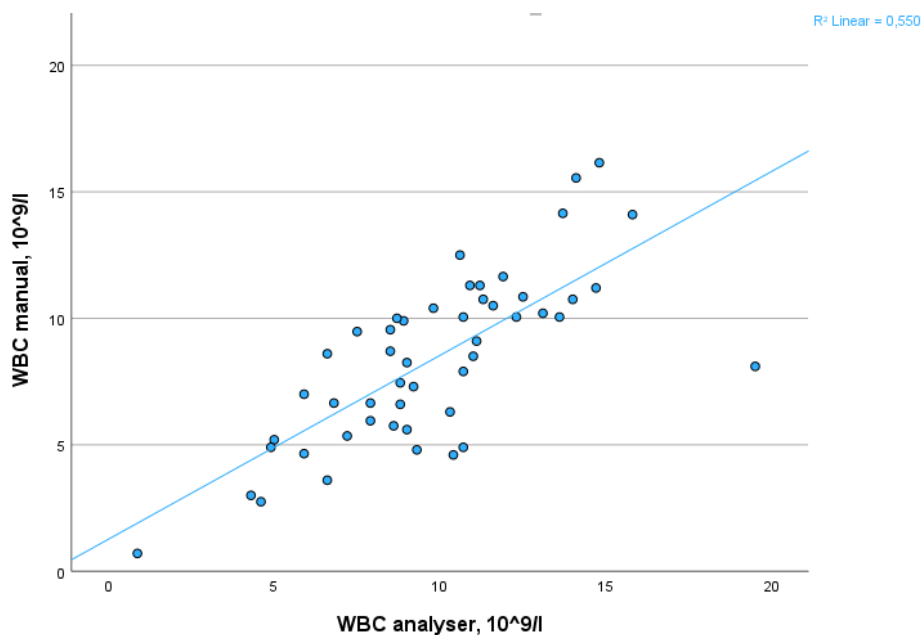
3.2.1. WBC skaičiavimo metodų palyginimas

Taikant Spearman koreliacijos analizę tarp rankinio (M_WBC) ir automatinio (A_WBC) leukocitų skaičiavimo metodų nustatyta stipri teigiama koreliacija ($r = 0,842$; $p < 0,001$). Šis rezultatas rodo, kad abiejų metodų gauti duomenys yra glaudžiai susiję, o tai leidžia teigti, jog abu metodai pateikia nuosekliai panašius rezultatus tiriant leukocitų kiekį (4 lentelė).

Lentelė nr. 4. Koreliacija tarp skirtingų ląstelių skaičiavimo metodų (N=50).

	M_WBC	A_WBC
M_WBC	1	p<0,001 r= 0,842
A_WBC	p<0,001 r= 0,842	1

Taip pat siekiant įvertinti A_WBC skaičiavimo galimybę prognozuoti M_WBC, buvo atlikta paprastoji **tiesinė regresijos analizė**. Modelis buvo statistiškai reikšmingas, $F(1, 48) = 58,67$, $p < 0,001$, ir paaiškino 55 % M_WBC skaičiaus variacijos ($R^2 = 0,550$) (Pav. 11). Nustatyta, kad A_WBC reikšmingai prognozuoja M_WBC ($\beta = 0,742$, $p < 0,001$). Šie rezultatai rodo, kad tarp A_WBC ir M_WBC skaičiavimo metodų egzistuoja stiprus teigiamas ryšys.



Pav. 11 tiesinė regresijos analizė tarp skirtingų metodų M_WBC (WBC manual, 10⁹/l) ir A_WBC (WBC analyser, 10⁹/l) . $R^2 = 0,550$.

Atlikus koreliaciją tarp skirtingų matavimo metodų (M_WBC ir A_WBC) ir kraujo ląstelių tipų, nustatyta, kad su monocitais koreliacija nėra statistiškai reikšminga, taip pat stipri koreliacija nenustatyta. Su limfocitais nustatyta statistiškai reikšminga stipri koreliacija. Tiriant granulocitus taip pat nustatyta statistiškai reikšminga stipri koreliacija (5 lentelė).

Lentelė nr. 5. Koreliacija tarp skirtingų kraujo ląstelių skaičiavimo metodų ir leukocitų. Lentelėje pateikiami vidurkiai $\pm$ SD 10⁹/l.

Ląstelių tipas	M_WBC	A_WBC	Koreliacija
Monocitai	1,149 $\pm$ 0,745	0,768 $\pm$ 0,2788	R = 0,168 p = 0,243
Limfocitai	1,708 $\pm$ 1,155	2,230 $\pm$ 0,9603	r = 0,355 p = 0,011
Granulocitai	6,735 $\pm$ 2,667	6,908 $\pm$ 2,974	R = 0,542 p < 0,001

Rezultatai parodė, kad stipriausia ir statistiškai reikšminga koreliacija tarp rankinio ir automatinio leukocitų skaičiavimo metodų buvo nustatyta vertinant granulocitų kiekius, tuo tarpu monocitų kiekių koreliacija buvo silpna ir nereikšminga. Limfocitų duomenys parodė vidutinio stiprumo ir statistiškai reikšmingą ryšį tarp abiejų metodų.

3.2.2 Kraujo baltųjų ląstelių tarpusavio sąveika

Atliekant Spearmano koreliacijos analizę, siekta įvertinti bendro leukocitų kiekio skaičiuoto ranka (M_WBC) ir ranka skaičiuotų skirtingų frakcijų (monocitų, eozinofilų, bazofilų, neutrofilų ir limfocitų) tarpusavio ryšius (6 lentelė). Tarp monocitų, eozinofilų ir bazofilų buvo nustatytos stiprios ir statistiškai reikšmingos teigiamos koreliacijos, rodančios glaudų šių ląstelių tarpusavio ryšį. Neutrofilai nekoreliavo reikšmingai su dauguma kitų frakcijų, išskyrus M_WBC, su kuriuo ryšys buvo stiprus. Limfocitai turėjo silpnas, tačiau reikšmingas koreliacijas su monocitais, eozinofilais, ir M_WBC.

Lentelė nr. 6. Koreliacija tarp monocitų, eozinofilų, bazofilų, neutrofilų, limfocitų ir M_WBC (N=50) lentelėje pateiktos p reikšmės kai $p \leq 0,003$ (Bonferoni korekcija).

	Monocitai	Eozinofilai	Bazofilai	Neutrofilai	Limfocitai	M_WBC
Monocitai	1 p= 0,001	r=0,537 p= 0,001	r=0,701 p= 0,001	r=0,171 p=0,235	r=0,368 p=0,009	r=0,619 p= 0,001
Eozinofilai	r=0,537 p= 0,001	1 p= 0,001	r=0,574 p= 0,001	r=0,274 p= 0,435	r=0,076 p=0,049	r=0,463 p= 0,001
Bazofilai	r=0,701 p= 0,001	r=0,574 p= 0,001	1 p= 0,001	r=0,274 p= 0,054	r=0,225 p=0,116	r=0,593 p= 0,001
Neutrofilai	r=0,171 p=0,235	r=0,274 p= 0,435	r=0,274 p=0,054	1 p= 0,001	r=0,076 p= 0,601	r=0,737 p= 0,001
Limfocitai	r=0,368 p=0,009	r=0,076 p=0,049	r=0,225 p=0,116	r=0,076 p= 0,601	1 p= 0,001	r=0,568 p= 0,001
M_WBC	r=0,619 p= 0,001	r=0,463 p= 0,001	r=0,593 p= 0,001	r=0,737 p= 0,001	r=0,568 p= 0,001	1 p= 0,001

Atliekant Spearmano koreliacijos analizę, siekta įvertinti bendro leukocitų kiekio skaičiuoto analizatoriumi (A_WBC) ir ranka skaičiuotų skirtingų frakcijų (monocitų, eozinofilų, bazofilų, neutrofilų ir limfocitų) tarpusavio ryšius (7 lentelė).

Lentelė nr. 7. Koreliacija tarp monocitų, eozinofilų, bazofilų, neutrofilų, limfocitų ir M_WBC (N=50) lentelėje pateiktos p reikšmės kai $p \leq 0,003$ (Bonferoni korekcija).

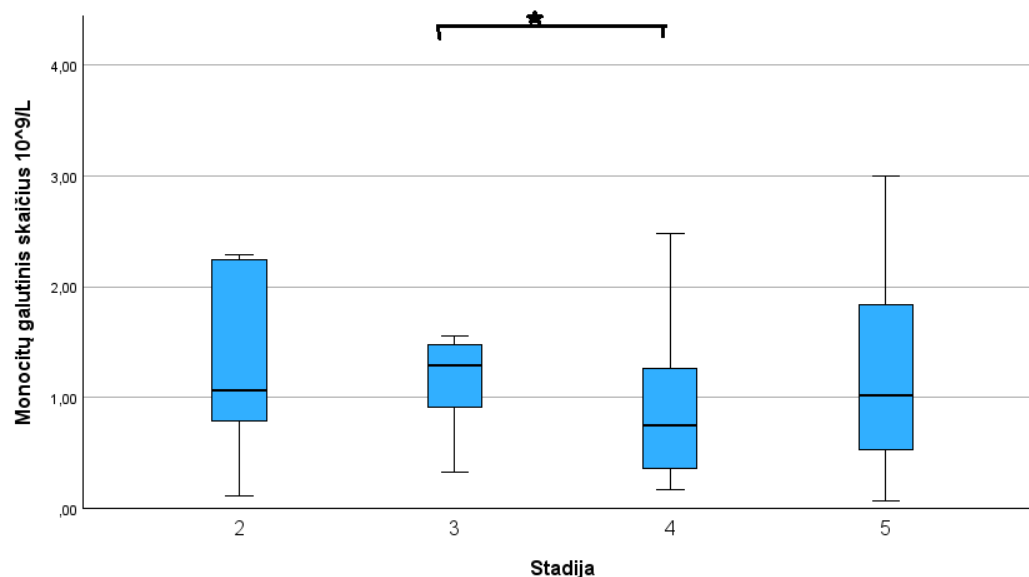
	Monocitai	Eozinofilai	Bazofilai	Neutrofilai	Limfocitai
A_WBC	r=0,625 p= 0,001	r=0,457 p= 0,001	r=0,555 p= 0,001	r=0,474 p= 0,001	r=0,443 p= 0,001

Lentelėje pateikti rezultatai rodo, kad automatinio leukocitų skaičiavimo metodo (A_WBC) rezultatai statistiškai reikšmingai koreliuoja su visų pagrindinių leukocitų frakcijų (monocitų, eozinofilų, bazofilų, neutrofilų ir limfocitų) skaičiumi. Stipriausia koreliacija nustatyta su monocitais ($r = 0,625$), o silpniausia – su limfocitais ($r = 0,443$), tačiau visais atvejais koreliacijos buvo reikšmingos ($p < 0,001$), kas rodo, jog A_WBC atspindi bendrą leukocitų frakcijų pasiskirstymo tendenciją.

3.2.2 Monocitai

Didžiausios monocitų medianos pastebimos buvo 3 stadijoje ($1,51 \times 10^9/L$ (min = 0,11; max = 2,29)), o mažiausios 2 stadijoje ($1,19 \times 10^9/L$ (min = 0,33; max = 2,36)).

Skirtumai tarp stadijų. Taikant KW metodą nustatyta, kad tarp 4 ir 3 stadijų buvo nustatyta statistiškai reikšminga reikšmė pagal ($H(3) = 4,119$, $p = 0,045$) (12 Pav.).



Pav. 12. Monocitų pasiskirstymas skirtingose vystymosi stadijose.

Skirtumai tarp lyčių. Atlikus Mann–Whitney U testą, nenustatyta statistiškai reikšmingo skirtumo tarp patinų ir patelių monocitų kiekių kraujyje ($U = 305,000$; $Z = -0,146$; $p = 0,884$). Tai rodo, kad lytis neturėjo reikšmingos įtakos monocitų koncentracijai tiriamojoje grupėje.

Skirtumai tarp mitybinės stadijos. Mann–Whitney U testas parodė, kad skirtumas tarp pup ir weaner jauniklių monocitų kiekių nebuvo statistiškai reikšmingas ($U = 231,000$; $Z = -1,547$; $p = 0,122$). Nors vidutinis rangas pup grupėje (28,44) buvo aukštesnis nei weaner (22,04), šis skirtumas nėra statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$). Tai rodo, kad monocitų koncentracijos tendencingai mažėjo vystantis, tačiau ši tendencija nebuvo pakankamai stipri, kad būtų laikoma statistiškai reikšminga.

Koreliacija. Atlikus Spearman koreliaciją tarp kūno masės ir monocitų kiekio buvo nustatyta labai silpna neigiama, statistiškai nereikšminga koreliacija ($r = -0,090$, $p=0,534$), todėl ryšys tarp šių kintamųjų laikytinas nereikšmingu.

3.2.3 Eozinofilai

Mažiausias eozinofilų medianos skaičius pastebimas 4 stadijoje ($0,508 \times 10^9/L$ (min= 0,22; max = 1,06), o didžiausias 2 stadijoje ($0,761 \times 10^9/L$ (min= 0,280; max = 1,344).

Skirtumai tarp stadijų. Atlikus neparametrinę analizę su KW metodu, nenustatyta reikšmingų skirtumų tarp stadijos ir eozinofilų skaičiaus ($H(3) = 2,376$, $p>0,05$).

Skirtumai tarp lyčių. Mann–Whitney U testas parodė, kad **eozinofilų kiekis nesiskyrė statistiškai reikšmingai tarp lyčių** ($U = 268,000$; $Z = -0,863$; $p = 0,388$). Nors patinėlių grupėje eozinofilų vidurkio rangas buvo šiek tiek didesnis (27,28) nei patelių (23,72), šis skirtumas nepasiekė statistiškai reikšmingos ribos ($p > 0,05$).

Skirtumai tarp mitybinės stadijos. Mann–Whitney U testas neparodė statistiškai reikšmingo skirtumo tarp mažųjų ir atjunkytų jauniklių eozinofilų kiekių ($U = 234,000$; $Z = -1,489$; $p = 0,136$). Nors pup grupėje vidurkio rangas (28,33) buvo didesnis nei weaner (22,17), skirtumas nepasiekė reikšmingumo ribos, todėl galima teigti, kad eozinofilų kiekis tarp šių dviejų vystymosi stadijų nesiskyrė reikšmingai.

Koreliacija. Atlikus Spearman koreliaciją tarp kūno masės ir eozinofilų kiekio buvo nustatyta labai silpna neigiama, statistiškai nereikšminga koreliacija ($r = -0,040$, $p=0,781$), todėl ryšys tarp šių kintamųjų laikytinas nereikšmingu.

3.2.4 Bazofilai

Mažiausias bazofilų medianos skaičius pastebimas 2 stadijoje ($0,425 \times 10^9/L$ (min= 0,381; max = 0,896), o didžiausias 5 stadijoje ($0,935 \times 10^9/L$ (min= 0,642; max = 1,61)).

Skirtumai tarp stadijų. Atlikus neparametrinę analizę su KW metodu, nenustatyta reikšmingų skirtumų tarp stadijos ir bazofilų skaičiaus ($H(3) = 3,031$, $p>0,05$).

Skirtumai tarp lyčių. Mann–Whitney U testas parodė, kad bazofilų kiekis statistiškai reikšmingai tarp lyčių nesiskyrė ($U = 249,000$; $Z = -1,232$; $p = 0,218$). Nors vidutinis rangas buvo aukštesnis patinų grupėje (28,04), palyginti su patelėmis (22,96), šis skirtumas nepasiekė statistinio reikšmingumo ribos ($p > 0,05$). Tai rodo, kad lytis neturėjo reikšmingos įtakos bazofilų koncentracijai tiriamųjų grupėje.

Skirtumai tarp mitybinės stadijos. Mann–Whitney U testas neparodė statistiškai reikšmingo skirtumo tarp pup ir weaner jauniklių bazofilų kiekių ($U = 298,000$; $Z = -0,243$; $p = 0,808$). Nors pup grupėje vidurkio rangas (26,04) buvo didesnis nei weaner (25,04), skirtumas nepasiekė reikšmingumo ribos, todėl galima teigti, kad bazofilų kiekis tarp šių dviejų vystymosi stadijų nesiskyrė reikšmingai.

Koreliacija. Spearman koreliacijos analizė parodė, kad tarp kūno masės ir bazofilų kiekio egzistuoja labai silpna teigiama koreliacija, kuri nebuvo statistiškai reikšminga ($r_s = 0,137$; $p = 0,343$).

3.2.5 Neutrofilai

Mažiausias bazofilų medianos skaičius pastebimas 5 stadijoje ($3,232 \times 10^9/L$ (min= 0,731; max = 11,23)), o didžiausias 2 stadijoje ($4,971 \times 10^9/L$ (min= 1,145; max = 7,768)).

Skirtumai tarp stadijų. Atlikus neparametrinę analizę su KW metodu, nenustatyta reikšmingų skirtumų tarp stadijos ir neutrofilų skaičiaus ($H(3) = 1,222$, $p > 0,05$).

Skirtumai tarp lyčių. Mann–Whitney U testas parodė, kad neutrofilų kiekis statistiškai reikšmingai tarp lyčių nesiskyrė ($U = 306,000$; $Z = -0,126$; $p = 0,900$). Nors vidutinis rangas buvo aukštesnis patinų grupėje (25,76), palyginti su patelėmis (25,24), šis skirtumas nepasiekė statistinio reikšmingumo ribos ($p > 0,05$). Tai rodo, kad lytis neturėjo reikšmingos įtakos neutrofilų koncentracijai tiriamųjų grupėje.

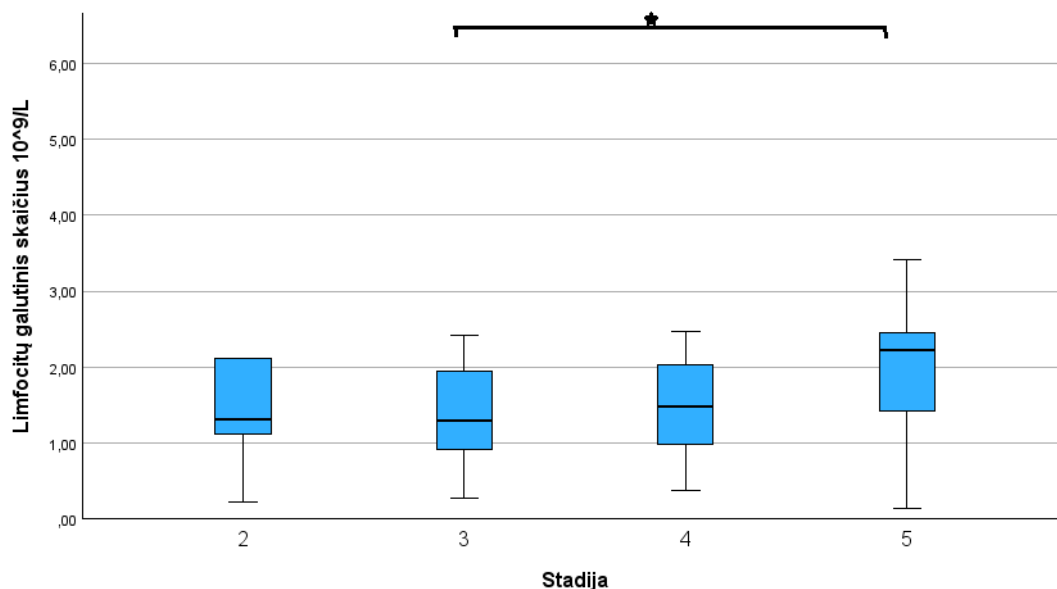
Skirtumai tarp mitybinės stadijos. Mann–Whitney U testas neparodė statistiškai reikšmingo skirtumo tarp pup ir weaner jauniklių neutrofilų kiekių ($U = 277,000$; $Z = -0,652$; $p = 0,514$). Nors pup grupėje vidurkio rangas (26,74) buvo didesnis nei weaner (24,04), skirtumas nepasiekė reikšmingumo ribos, todėl galima teigti, kad neutrofilų kiekis tarp šių dviejų vystymosi stadijų nesiskyrė reikšmingai.

Koreliacija. Atlikus Spearman koreliaciją tarp kūno masės ir neutrofilų kiekio buvo nustatyta labai silpna neigiama, statistiškai nereikšminga koreliacija ($r = -0,020$, $p = 0,890$), todėl ryšys tarp šių kintamųjų laikytinas nereikšmingu.

3.2.6 Limfocitai

Mažiausias limfocitų vidurkio skaičius pastebimas 3 stadijoje ($1,29 \times 10^9/L$ (min= 0,274; max = 4,336)), o didžiausias 5 (2,229 $\times 10^9/L$ (min= 0,128; max = 5,66)).

Skirtumai tarp stadijų. Atlikus neparametrinę analizę su KW metodu, nustatyta reikšmingų skirtumų tarp 3-5 stadijos ir neutrofilų skaičiaus ($H(3) = 4,341$, $p > 0,046$) (13 pav.).



13 pav. Limfocitų pasiskirstymas skirtingose vystymosi stadijose.

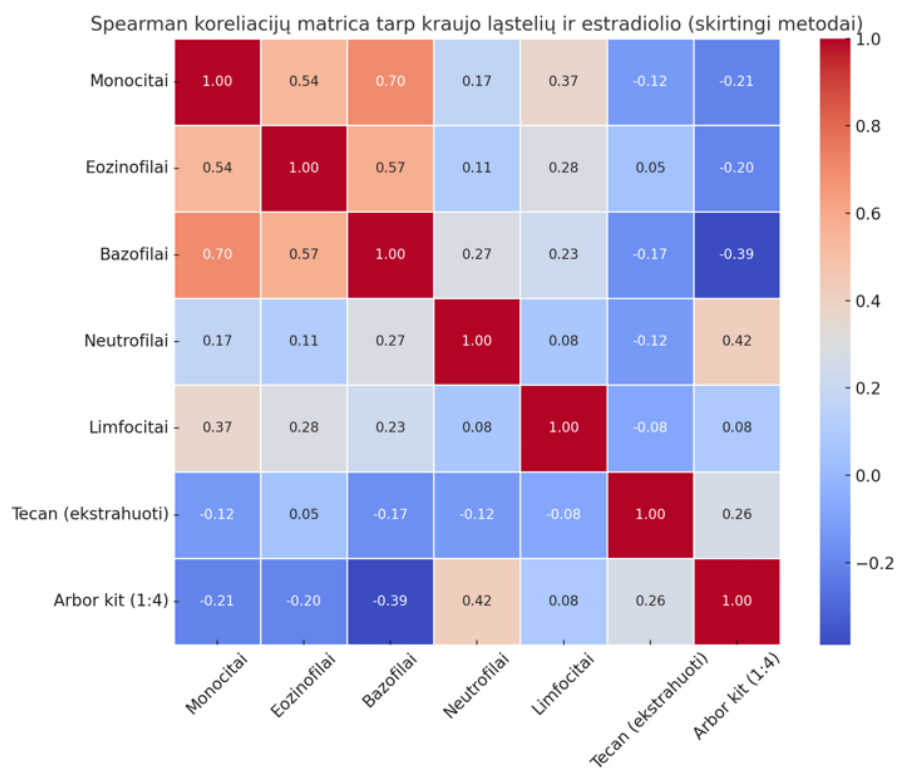
Skirtumai tarp lyčių. Mann–Whitney U testas parodė, kad limfocitų kiekis statistiškai reikšmingai tarp lyčių nesiskyrė ($U = 311,000$; $Z = -0,029$; $p = 0,977$). Nors vidutinis rangas buvo aukštesnis patelių grupėje (25,56), palyginti su patinėliais (25,44), šis skirtumas nepasiekė statistinio reikšmingumo ribos ($p > 0,05$). Tai rodo, kad lytis neturėjo reikšmingos įtakos neutrofilų koncentracijai tiriamųjų grupėje.

Skirtumai tarp mitybinės stadijos. Mann–Whitney U testas neparodė statistiškai reikšmingo skirtumo tarp pup ir weaner jauniklių neutrofilų kiekių ($U = 244,000$; $Z = -1,372$; $p = 0,170$). Nors pup grupėje vidurkio rangas (22,89) buvo mažesnis nei weaner (28,57), skirtumas nepasiekė reikšmingumo ribos, todėl galima teigti, kad limfocitų kiekis tarp šių dviejų vystymosi stadijų nesiskyrė reikšmingai.

Koreliacija. Atlikus Spearman koreliaciją tarp kūno masės ir neutrofilų kiekio buvo nustatyta labai silpna neigiama, statistiškai nereikšminga koreliacija ($r = 0,060$, $p = 0,680$), todėl ryšys tarp šių kintamųjų laikytinas nereikšmingu.

3.3 Estradiolio ir hematologinių parametų tarpusavio analizė

Atlikus Spearman koreliacijos analizę patikrinta, ar estradiolio koncentracijos jauniklių kraujyje koreliuoja su hematologiniais parametrais 14 pav.



14 pav. Koreliacijų matrica tarp kraujo ląstelių ir estradiolio.

Bazofilų skaičius turėjo vidutinio stiprumo neigiamą koreliaciją su estradiolio (1:4) koncentracija ($r_s = -0,388$), tačiau šis ryšys nebuvo statistiškai reikšmingas ($p = 0,091$). Monocitų kiekis koreliavo silpnai neigiamai su estradioliu ($r_s = -0,208$; $p = 0,382$). Eozinofilų, neutrofilų ir limfocitų skaičius nekoreliavo reikšmingai su estradiolio kiekiu ($p > 0,05$).

4. Rezultatų aptarimas

Gauti rezultatai atskleidžia ryšias biologines tendencijas, tokias kaip 17β -estradiolio koncentracijos mažėjimas didėjant vystymosi stadijoms, reikšmingi leukocitų frakcijų pokyčiai (ypač monocitų, eozinofilų ir limfocitų) bei neutrofilų dominavimo kraujyje mažėjimas su amžiumi. Šie pokyčiai, tikėtina, siejami su besivystančios imuninės sistemos aktyvacija – limfocitų skaičiaus augimas būdingas įgyto imuniteto formavimuisi, o neutrofilų kiekio mažėjimas ar nusistovėjimas rodo, kad mažėja įgimto atsako dominavimas (Ross et al., 1993). Taip pat estradiolis, kaip atskleidžiama kituose tyrimuose, gali daryti įtaką limfocitų aktyvacijai ir citokinų sekrecijai, reguliuodamas imuninį atsaką vystymosi metu (Kovats, 2015; Cutolo et al., 2004).

4.1 Estradiolio koncentracijų dinamika

Tyrimo metu nustatėme, kad 17β -estradiolio koncentracija statistiškai reikšmingai skyrėsi tarp vystymosi stadijų. Žymiausi pokyčiai užfiksuoti tarp 2 ir 3, bei 2 ir 5 vystymosi stadijų, kuriose hormono kiekis reikšmingai mažėjo. Tai leidžia daryti prielaidą, kad aukščiausias estradiolio kiekis 2 stadijoje yra neatsiejamas nuo aktyvios žindymo fazės, kurios metu organizme vyksta intensyvūs fiziologiniai ir imunologiniai procesai. Vėlesnėse augimo stadijose (3–5), kurios apima atjunkymą ir badavimo periodą, estradiolio kiekis reikšmingai sumažėja, o tai rodo hormoninę adaptaciją pasikeitusioms metabolinėms sąlygoms. Šie rezultatai sutampa su Sherman-Cooney et al. (2005) pateiktais duomenimis, kur buvo pastebėta, kad jūrų žinduolių jaunikliams estradiolio koncentracija padidėja vystymosi metu, tačiau šis padidėjimas yra laikinas ir paprastai susijęs su kritiniais fiziologiniais etapais, tokiais kaip žindymo pabaiga, brendimo pradžia ar imuninės sistemos aktyvacija. Estradiolis, kaip yra žinoma, veikia limfocitų proliferaciją, citokinų sekreciją ir B ląstelių diferenciaciją (Straub, 2007; Kovats, 2015), todėl jo laikinas suaktyvėjimas vystymosi pradžioje gali būti siejamas su imuninio atsako stiprinimu žindymo laikotarpiu. Be to, šio tyrimo rezultatai atitinka kitus darbus su jūros žinduoliais (Zhang et al., 2014), kuriuose nustatyta, kad estradiolio kiekis dažniausiai koreliuoja su vystymosi stadija, o ne su absoliučiu amžiumi, todėl jo koncentracijos pokyčiai yra geras biologinis rodiklis apibūdinantis fiziologinį perėjimą tarp priklausomybės nuo motinos ir savarankiško gyvenimo pradžios. Nors kai kurie skirtumai nebuvo statistiškai reikšmingi, pastebimos kryptingos tendencijos, kad hormoninis aktyvumas gali vykti ir be ryškių pikų, tačiau vis tiek turėti funkcinę reikšmę. Galima manyti, kad tokie pokyčiai atspindi organizmo prisitaikymą prie energijos deficito, metabolinių iššūkių ar augimo tempų, būdingų laukiniams žinduoliams atjunkymo laikotarpiu.

4.2 Metodų taikymo vertinimas ir rekomendacijos

Tyrimo metu paaiškėjo, kad tiek ELISA, tiek hematologiniai metodai, ypač rankinis ląstelių skaičiavimas, gali būti labai naudingi vertinant estradiolio pokyčius bei leukocitų sudėtį, atspindinčią imuninės sistemos būklę. Visgi jų tikslumui turi įtakos daugybė veiksnių – svarbu, ar mėginiai buvo ekstrahuoti, kokio tipo rinkinys naudotas (pavyzdžiui, Tecan ar Arbor), bei kokiomis sąlygomis vyko analizė. Kaip rodo Graham ir Sait atlikti tyrimai, šie veiksniai ženkliai lemia gautų rezultatų patikimumą. Praktikoje, pavyzdžiui, žinoma, kad Tecan rinkiniai veikia tinkamai tik su ekstrahuotais mėginiais (Survilienė, 2022), todėl jų taikymas kitaip gali iškraipyti duomenis. Be to, automatiniai kraujo analizatoriai dažnai nėra pritaikyti laukinių gyvūnų kraujui, tad jų parodymai turėtų būti vertinami atsargiai, ypač jei jie nėra papildomi rankiniais ar mikroskopiniais metodais.

4.3 Kraujo parametrų pokyčiai

Baltųjų kraujo kūnelių (WBC) analizė, atlikta trimis metodais – rankiniu skaičiavimu (M_WBC), analizatoriumi (A_WBC) ir morfologiniu vertinimu – parodė, kad nors tarp metodų rasta statistiškai reikšmingų koreliacijų, praktinė jų reikšmė buvo ribota dėl gana nedidelio koreliacijos koeficiento dydžio (pvz., $r \approx 0,3$). Tai rodo, kad metodai gali matuoti tą patį biologinį procesą, tačiau ne identišškai. Vien regresijos analizė tarp A_WBC ir M_WBC parodė vidutiniškai stiprų ryšį ($R^2 = 0,550$), leidžiantį tam tikru tikslumu prognozuoti rankiniu būdu nustatytas reikšmes pagal analizatoriaus duomenis. Vis dėlto būtina įvertinti metodologinius skirtumus – automatiniai hematologiniai analizatoriai dažnai nėra pritaikyti ruonių kraujo specifikai, todėl gali nevisiškai atpažinti ar teisingai klasifikuoti netipines ląsteles (Steell, S. Clay, et al., 2020), ypač esant netipinių granuliuotų ląstelių buvimui. Taip pat galima prielaida, kad vertinant limfocitus dalis jų galėjo būti neteisingai identifikuoti kaip monocitai ir atvirkščiai, kas galėjo turėti įtakos koreliacijos rezultatams tarp šių ląstelių tipų.

Tarp atskirų leukocitų frakcijų nustatyta keletas svarbių koreliacijų, kurios patvirtina tam tikrus fiziologinius ryšius. Stipri ir statistiškai reikšminga koreliacija egzistuoja tarp monocitų ir eozinofilų bei monocitų ir bazofilų. Taip pat stiprus ryšys nustatytas tarp bazofilų ir eozinofilų. Šie rezultatai atitinka literatūroje (Poulin et al., 1994; Kovats, 2015) aprašytas uždegimines ar parazitines reakcijas, kurių metu šios trys ląstelių grupės dažnai aktyvuojamos kartu – tai gali būti susiję su imuniniu atsaku į aplinkos stresorius ar infekcijas.

Be to, matyti, kad bendras leukocitų kiekis (M_WBC) stipriai koreliuoja su monocitų ir neutrofilų skaičiumi kraujyje, galima daryti prielaidą, jog šios dvi frakcijos reikšmingai prisideda prie bendro leukocitų kiekio pokyčių. Šis atradimas taip pat dera su literatūroje dėstoma informacija, kuri

teigia, kad monocitai ir neutrofilai yra pagrindiniai pirminio uždegiminio atsako komponentai, o jų skaičiaus padidėjimas paprastai laikomas vienu pirmųjų imuninio atsako žymenų (Straub, 2007).

Tuo tarpu limfocitų koreliacijos su kitomis ląstelėmis buvo silpnesnės, tačiau reikšmingos – ypač su monocitais ir bazofilais. Tai gali atspindėti limfocitų gebėjimą savarankiškai vystytis arba skirtingą funkciją imuniniame atsake. Pastebėta, kad limfocitų kiekis padidėjo vėlesnėse vystymosi stadijose, kas gali rodyti įgyto imuniteto brendimą. Ross et al. (1993) taip pat aprašo, kad limfocitų skaičius ruonių jaunikliams padidėja artėjant atjunkymui, kai gyvūnai pradeda savarankiškai sąveikauti su aplinka ir jų imuninė sistema aktyviai adaptuojasi.

4.4 Apibendrinimas

Tyrimo rezultatai parodė, kad 17β -estradiolio koncentracija Baltijos pilkųjų ruonių jauniklių organizme reikšmingai kito priklausomai nuo vystymosi stadijos – didžiausia ji yra ankstyvose stadijose, o vėliau mažėjo. Tai siejama su žindymo pabaiga ir hormonine adaptacija. Kartu nustatyti reikšmingi leukocitų frakcijų (ypač monocitų, limfocitų ir neutrofilų) kiekio pokyčiai, rodantys aktyvų imuninės sistemos brendimą – limfocitų daugėjimas vėlesnėse stadijose rodo įgyto imuniteto formavimąsi, o neutrofilų mažėjimas – įgimto atsako mažėjimą. Naudotų metodų analizė atskleidė, kad rankinis (M_WBC) leukocitų skaičiavimas ir tinkamai pritaikytas ELISA metodas yra tinkami laukinių jūrinių žinduolių tyrimams, tačiau jų patikimumas priklauso nuo mėginių paruošimo (ekstrahavimo) ir analizės sąlygų. Apibendrinant galima teigti, kad tyrimas patvirtina glaudų ryšį tarp hormoninių, imunologinių ir augimo procesų bei pabrėžia standartizuotų metodų svarbą atliekant fiziologinius tyrimus su laukiniais gyvūnais.

Nustatytos tendencijos ir statistiškai reikšmingi ryšiai dera su esamais literatūros duomenimis apie laukinių jūrinių žinduolių fiziologinę raidą. Tuo pačiu, rezultatai atskleidžia ir metodinius iššūkius, susijusius su analizės technika bei lauko tyrimų sąlygomis. Ateities tyrimuose rekomenduojama:

- siekti vienodesnio imčių pasiskirstymo tarp stadijų,
- derinti hormoninius ir imunologinius parametrus, kad būtų galima visapusiškai įvertinti jauniklių fiziologinę būklę.
- Dar detaliau vertinti limfocitus skaičiuojant per mikroskopą

Autoriaus asmeninis indėlis

Autorė atliko statistinę duomenų analizę (Formal Analysis), vykdė fermentinės imunofermentinės analizės (ELISA) tyrimus (Investigation), prisidėjo prie duomenų interpretavimo (Data Curation) ir tyrimo metodikos taikymo (Methodology).

Darbo vadovas padėjo formuluojant tyrimo idėją (Conceptualization) bei konsultavo visais tyrimo vykdymo ir rezultatų aptarimo etapais. Taip pat vadovas konsultavo viso Darbo rašymo metu.

Išvados

1. Estradiolio koncentracijos skyrėsi priklausomai nuo pasirinkto ELISA rinkinio (Tecan ar Arbor) ir mėginio apdorojimo (ekstrahuotas ar neekstrahuotas).
2. Gauta reikšminga koreliacija tarp leukocitų koncentracijų, gautų rankinio leukocitų skaičiavimo metodu (M_WBC) ir automatinio analizatoriaus pagalba (A_WBC), tačiau atskirų leukocitų frakcijų rezultatai tarp metodų dažnai nesutapo. Rankinio skaičiavimo duomenimis identifikuotos stiprios tarpusavio koreliacijos tarp kai kurių ląstelių tipų, rodančios jų glaudų fiziologinį ryšį.
3. Nustatyta, kad estradiolio koncentracija reikšmingai mažėjo progresuojant vystymosi stadijoms.
4. Nustatyta, kad nors tiesioginių, stiprių ir statistiškai reikšmingų koreliacijų tarp estradiolio ir atskirų hematologinių rodiklių nenustatyta, pastebėtos tendencijos leidžia manyti apie galimą netiesioginį estradiolio poveikį imunologiniams procesams.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Agija Poškutė

Magistro baigiamasis darbas

**Estradiolio koncentracijos ir hematologinių rodiklių sąsaja Baltijos
pilkujų ruonių (*lot. Halichoerus grypus*) jaunikliuose**

SANTRAUKA

Iš jūrinių žinduolių Baltijos jūroje labiausiai paplitę yra pilkieji ruoniai (*lot. Halichoerus grypus*), kurie dėl savo vietos mitybos grandinėje laikomi svarbiais ekosistemos būklės indikatoriais. Dėl aplinkos taršos ir hormonų pusiausvyros sutrikimų vis daugiau dėmesio skiriama jauniklių vystymosi laikotarpiui – ypač endokrininių ir imuninių veiksnių sąveikai.

Šio magistro darbo tikslas – įvertinti steroidinio hormono estradiolio koncentracijų pokyčius ir jų sąsajas su hematologiniais bei morfometriniais rodikliais pilkujų ruonių jauniklių vystymosi metu. Darbo uždaviniai: (1) nustatyti estradiolio koncentracijas naudojant skirtingus ELISA rinkinius; (2) palyginti ekstrakcijos įtaką hormonų nustatymui; (3) įvertinti kraujo parametrus, taikant rankinius ir automatinius skaičiavimo metodus; (4) įvertinti ryšį tarp estradiolio ir leukocitų koncentracijų bei vystymosi stadijų. Tyrime lyginti skirtingi estradiolio nustatymo metodai, vertinta leukocitų sudėtis ir jų sąsajos su kūno mase, lytimi bei vystymosi stadija. Gauti rezultatai atskleidė reikšmingus leukocitų kaitos bei estradiolio koncentracijos ryšius su vystymusi, o tyrimo išvados prisideda prie jauniklių fiziologijos ir aplinkos poveikio vertinimo Baltijos jūros ruonių populiacijose.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Agija Poškutė

Master's Thesis

**Link Between Estradiol Concentrations and Hematological Parameters
in Baltic Grey Seal (*lot. Halichoerus grypus*) Pups**

Summary

Among marine mammals in the Baltic Sea, grey seals (*Halichoerus grypus*) are the most widespread species and are considered important indicators of ecosystem health due to their top position in the food chain. Increasing attention is being paid to the developmental period of pups, especially to the interaction between endocrine and immune factors, in the context of environmental pollution and hormonal imbalance.

The aim of this Master's thesis is to assess the changes in estradiol concentrations—a steroid hormone—and their association with hematological and morphometric parameters during the early development of grey seal pups. The objectives of the study are: (1) to determine estradiol concentrations using different ELISA kits; (2) to compare the effect of sample extraction on hormone quantification; (3) to evaluate blood parameters using both manual and automated counting methods; and (4) to assess the relationship between estradiol levels, leukocyte counts, and developmental stages. The study compares different estradiol measurement methods, evaluates leukocyte composition, and analyzes their association with body mass, sex, and developmental stage. The results revealed significant relationships between leukocyte variation and estradiol concentration during development, contributing to a better understanding of pup physiology and the effects of environmental factors on Baltic grey seal populations.

Literatūra

1. Ahlgren, H., Bro-Jørgensen, M. H., Glykou, A., Schmölcke, U., Angerbjörn, A., Olsen, M. T., & Lidén, K. (2022). The Baltic grey seal: A 9000-year history of presence and absence. *Holocene*, 32(6), 569–577. <https://doi.org/10.1177/09596836221080764>
2. Aquatic Biome. (n.d.). <https://education.nationalgeographic.org/resource/aquatic-biome>
3. Armstrong, Holly Clare. „Can we distinguish eustress from distress in marine mammals? Trade-offs in expression of molecular stress markers and consequences for cell damage and whole-animal fitness measures in grey seals (*Halichoerus grypus*)“. *School of Biological and Marine Sciences Theses*, 2019 m. sausio, <https://pearl.plymouth.ac.uk/bms-theses/430>.
4. Bäcklin, Bredhult, & Olovsson, (2003). Proliferative Effects of Estradiol, Progesterone, and Two CB Congeners and Their Metabolites on Gray Seal (*Halichoerus grypus*) Uterine Myocytes in Vitro. *Toxicological Sciences*, 75(1), 154–160. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg161>
5. Beck, Carrie A., et al. “Sex Differences in Grey Seal Diet Reflect Seasonal Variation in Foraging Behaviour and Reproductive Expenditure: Evidence from Quantitative Fatty Acid Signature Analysis.” *Journal of Animal Ecology*, vol. 76, no. 3, May 2007, pp. 490–502. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2007.01215.x>.
6. Bennett, Fedak, Moss, Pomeroy, Speakman, & Hall, (2012a). 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. *Journal of Experimental Biology*. <https://doi.org/10.1242/jeb.077438>
7. Bennett, Moss, Pomeroy, Speakman, & Fedak, (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. Part a, Molecular & Integrative Physiology*, 161(1), 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.09.003>
8. Bennett, Speakman, Moss, Pomeroy, & Fedak, (2007). Effects of mass and body composition on fasting fuel utilisation in grey seal pups (*Halichoerus grypus* Fabricius): an experimental study using supplementary feeding. *Journal of Experimental Biology*, 210(17), 3043–3053. <https://doi.org/10.1242/jeb.009381>
9. Boyd, (1984a). Gonadotrophin and progesterone concentrations in placentae of grey seals (*Halichoerus grypus*). *Reproduction*, 72(2), 521–528. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0720521>
10. Boyd, (1991). Changes in plasma progesterone and prolactin concentrations during the annual cycle and the role of prolactin in the maintenance of lactation and luteal development in the Antarctic

- fur seal (*Arctocephalus gazella*). *Reproduction*, 91(2), 637–647.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0910637>
11. Boshoven, M. (2024a, February 14). Grey seal - Sealcentre Pieterburen. Sealcentre Pieterburen.
<https://www.zeehondencentrum.nl/en/knowledge-repository/seal-species/grey-seal/#:~:text=Grey%20seal%20pups,-Grey%20seal%20pups&text=Pups%20weigh%20between%2011%20and,in%20the%20first%20fe>
[w%20w](https://www.zeehondencentrum.nl/en/knowledge-repository/seal-species/grey-seal/#:~:text=Grey%20seal%20pups,-Grey%20seal%20pups&text=Pups%20weigh%20between%2011%20and,in%20the%20first%20fe)
 12. Cable, & Grider, (2023, May 1). Physiology, progesterone. StatPearls - NCBI Bookshelf.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558960/>
 13. Castillo-Castrejon, Jansson, & Powell, (2018). Fetal Maternal unit. In Elsevier eBooks (pp. 477–483). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.64674-3>
 14. Chowdhury, Khan, Kim, Harris, Longhurst, & Bolan, (2016). Zeolite for nutrient stripping from farm effluents. In Elsevier eBooks (pp. 569–589). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803837-6.00022-6>
 15. Cutolo, Maurizio, et al. “Synovial Fluid Estrogens in Rheumatoid Arthritis.” *Autoimmunity Reviews*, vol. 3, no. 3, Mar. 2004, pp. 193–98. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2003.08.003>.
 16. Dahlberg, Apler, Vogel, Wiberg, & Josefsson, (2020a). Persistent organic pollutants in wood fiber–contaminated sediments from the Baltic Sea. *Journal of Soils and Sediments*, 20(5), 2471–2483. <https://doi.org/10.1007/s11368-020-02610-6>
 17. Esipova, Polina, et al. “Blood Morphology and Hematology of Adult Baikal Seals (*Pusa Sibirica* Gmelin, 1788) Under Professional Care.” *Animals*, vol. 15, no. 2, Jan. 2025, p. 217. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.3390/ani15020217>.
 18. Fisheries (n.d.-a). Gray seal. NOAA. <https://www.fisheries.noaa.gov/species/gray-seal>
 19. Gårdmark, Anna, et al. “Does Predation by Grey Seals (*Halichoerus Grypus*) Affect Bothnian Sea Herring Stock Estimates?” *ICES Journal of Marine Science*, vol. 69, no. 8, Sept. 2012, pp. 1448–56. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1093/icesjms/fss099>
 20. Graham, Katherine M., et al. “Stress and Reproductive Events Detected in North Atlantic Right Whale Blubber Using a Simplified Hormone Extraction Protocol.” *Conservation Physiology*, edited by Steven Cooke, vol. 9, no. 1, Jan. 2021, p. coaa133. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1093/conphys/coaa133>.

21. Grey seal (*Halichoerus grypus*) - MarLIN - The Marine Life Information Network. (n.d.).
<https://www.marlin.ac.uk/species/detail/1995>
22. Hall, "Blood Chemistry and Hematology of Gray Seal (*Halichoerus Grypus*) Pups from Birth to Postweaning." *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, vol. 29, no. 4, 1998, pp. 401–07. JSTOR, <http://www.jstor.org/stable/20095791>. Accessed 25 May 2025. https://www.jstor.org/stable/pdf/20095791.pdf?refreqid=fastly-default%3Aedc9cf709c0ca806a02ba4b4473f17c5&ab_segments=&initiator=&acceptTC=1
23. Hall, & Russell, (2018). Gray seal. In Elsevier eBooks (pp. 420–422).
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804327-1.00139-4>
24. Hall, (1998). Blood Chemistry and Hematology of Gray Seal (*Halichoerus grypus*) Pups from Birth to Postweaning. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 29(4), 401–407.
<http://www.jstor.org/stable/20095791>
25. Hariri, & Rehman, (2023, June 28). Estradiol. StatPearls - NCBI Bookshelf.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549797/#:~:text=Estradiol%20is%20a%20hormone%20made,during%20a%20woman's%20reproductive%20years.>
26. HELCOM. (2023). Grey seal distribution. HELCOM Indicators.
<https://indicators.helcom.fi/indicator/grey-seal-distribution/Hobson>,
27. Hoydal, Styris, Ciesielski, Letcher, Dam, & Jenssen, (2017). Steroid hormones and persistent organic pollutants in plasma from North-eastern Atlantic pilot whales. *Environmental Research*, 159, 613–621. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.09.003>
28. Jenssen, Åsmul, Ekker, & Vongraven, (2010a). To go for a swim or not? Consequences of neonatal aquatic dispersal behaviour for growth in grey seal pups. *Animal Behaviour*, 80(4), 667–673. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2010.06.028>
29. Kauhala, & Kurkilahti, (2019). Delayed effects of prey fish quality and winter temperature during the birth year on adult size and reproductive rate of Baltic grey seals. *Mammal Research*, 65(1), 117–126. <https://doi.org/10.1007/s13364-019-00454-1>
30. Kerr, (1989). *Veterinary Laboratory Medicine, Clinical Biochemistry and Haematology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, UK.
31. Knezevic, Emilija, ir kt. „The Role of Cortisol in Chronic Stress, Neurodegenerative Diseases, and Psychological Disorders“. *Cells*, t. 12, nr. 23, 2023 m. lapkričio, p. 2726. *PubMed Central*, <https://doi.org/10.3390/cells12232726>

32. Kovats, Susan. “Estrogen Receptors Regulate Innate Immune Cells and Signaling Pathways.” *Cellular Immunology*, vol. 294, no. 2, Apr. 2015, pp. 63–69. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.01.018>.
33. LGC Standards. 17-Beta-Estradiol | CAS 50-28-2 [Internet]. [cited 2025 May 24]. Available from: <https://www.lgcstandards.com/DE/en/17-beta-Estradiol/p/DRE-C13213100>
34. Marine mammal species. (2009a). In Elsevier eBooks (pp. 1259–1261). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-373553-9.00291-1>
35. Marwaha, Komal. “Preparation and Examination of Peripheral Blood Smear.” *Practical Hematology for BDS*, by Komal Marwaha, Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd., 2010, pp. 55–55. *DOI.org (Crossref)*, https://doi.org/10.5005/jp/books/11445_7.
36. Noël, Dangerfield, Jeffries, Lambourn, Lance, Helbing, Lebeuf, & Ross, (2017). Polychlorinated Biphenyl-Related Alterations of the Expression of Essential Genes in Harbour Seals (*Phoca vitulina*) from Coastal Sites in Canada and the United States. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 73(2), 310–321. <https://doi.org/10.1007/s00244-016-0362-9>
37. Ocean pollution and marine debris. (n.d.). National Oceanic and Atmospheric Administration. <https://www.noaa.gov/education/resource-collections/ocean-coasts/ocean-pollution>
38. Oceanographic Magazine. (2023a, February 15). Protecting grey seals - Oceanographic. <https://oceanographicmagazine.com/features/protecting-grey-seals/#:~:text=On%20average%20grey%20seals%20can,before%20her%20pup%20is%20weaned>.
39. Ojha, & Tiwary, (2021). Organic pollutants in water and its health risk assessment through consumption. In Elsevier eBooks (pp. 237–250). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-824058-8.00039-6>
40. Organic pollutants « World Ocean Review. (n.d.). <https://worldoceanreview.com/en/worldoceanreview/organic-pollutants/>
41. Pomeroy, et al. “Expansion of a Grey Seal (*Halichoerus Grypus*) Breeding Colony: Changes in Pupping Site Use at the Isle of May, Scotland.” *Journal of Zoology*, vol. 250, no. 1, Jan. 2000, pp. 1–12. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2000.tb00573.x>.
42. Poulin, et al. “Changes in Leucocyte Concentrations in Grey Seals (*Halichoerus Grypus*) in Relation to Temperature and Photoperiod.” *Journal of Thermal Biology*, vol. 19, no. 1, Jan. 1994, pp. 63–73. *ui.adsabs.harvard.edu*, [https://doi.org/10.1016/0306-4565\(94\)90010-8](https://doi.org/10.1016/0306-4565(94)90010-8).
43. PubChem. (n.d.). Estradiol. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5757>

44. Rana, Milke, & Gałczyńska, (2021). Inorganic and organic pollutants in Baltic Sea Region and Feasible Circular Economy Perspectives for Waste Management: A review. Springer eBooks, 1–35. https://doi.org/10.1007/978-981-15-7525-9_80-1
45. Robinson *Isle of May 2016: Beginner's guide to pups and meet Charlie* [Internet]. kellyrobinson-science.wordpress.com; 2016 Nov 14 [cited 2025 May 9]. Available from: <https://kellyrobinson-science.wordpress.com/2016/11/14/isle-of-may-2016-beginners-guide-to-pups-and-meet-charlie/>
46. Ross, Ellis, Ikonomou, Barrett-Lennard, & Addison, (2000). High PCB Concentrations in Free-Ranging Pacific Killer Whales, *Orcinus orca*: Effects of Age, Sex and Dietary Preference. *Marine Pollution Bulletin*, 40(6), 504–515. [https://doi.org/10.1016/s0025-326x\(99\)00233-7](https://doi.org/10.1016/s0025-326x(99)00233-7)
47. Sayer, and Witt, (2018) Special Area of Conservation Condition Monitoring: Grey seals (*Halichoerus grypus*) in the Isles of Scilly during the 2016 pupping season. Report Commissioned for Natural England (NECR261). ISBN: 978-1-78354-509-4.
48. Sait, Survilienè, Jüssi, Gonzalez, Ciesielski, Jenssen, & Asimakopoulos, (2023). Determination of steroid hormones in grey seal (*Halichoerus grypus*) blood plasma using convergence chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta*, 254, 124109. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124109>
49. Salcedo, S., et al. “Biomonitoring of Persistent Pollutants in Grey Seal (*Halichoerus Seagrypus*) Pups from the Gulf of Riga, Baltic Sea.” *Marine Pollution Bulletin*, vol. 209, Dec. 2024, p. 117198. *ScienceDirect*, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2024.117198>.
50. Sherman-Cooney, Ortiz, Noren, Pagarigan, Ortiz, & Talamantes, (2005). Estradiol and Testosterone Concentrations Increase with Fasting in Weaned Pups of the Northern Elephant Seal (*Mirounga angustirostris*). *Physiological and Biochemical Zoology*, 78(1), 55–59. <https://doi.org/10.1086/425193>
51. Sonne, Siebert, Gonnsen, Desforges, Eulaers, Persson, Roos, Bäcklin, Kauhala, Olsen, Harding, Treu, Galatius, Andersen-Ranberg, Gross, Lakemeyer, Lehnert, Lam, Peng, & Dietz, (2020a). Health effects from contaminant exposure in Baltic Sea birds and marine mammals: A review. *Environment International*, 139, 105725. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105725>
52. Sormo, Skaare, Lydersen, Kovacs, Hammill, & Jenssen, (2003). Partitioning of persistent organic pollutants in grey seal (*Halichoerus grypus*) mother–pup pairs. *Science of the Total Environment*, 302(1–3), 145–155. [https://doi.org/10.1016/s0048-9697\(02\)00300-5](https://doi.org/10.1016/s0048-9697(02)00300-5)
53. State of the Baltic Sea. (n.d.-a). Race for the Baltic. <https://www.raceforthebaltic.com/baltic-sea>

54. Steell, S. Clay, et al. "Artificial Light at Night Does Not Alter Heart Rate or Locomotor Behaviour in Caribbean Spiny Lobster (*Panulirus Argus*): Insights into Light Pollution and Physiological Disturbance Using Biologgers." *Conservation Physiology*, edited by Craig Franklin, vol. 8, no. 1, Jan. 2020, p. coaa097. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1093/conphys/coaa097>.
55. Straub, Rainer H. "The Complex Role of Estrogens in Inflammation." *Endocrine Reviews*, vol. 28, no. 5, Aug. 2007, pp. 521–74. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1210/er.2007-0001>.
56. Survilienė, Rukšėnas, Pomeroy, Moss, & Bennett, (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>
57. Troisi, Barton, Liori, & Nyman, (2020). Polychlorinated biphenyls (PCBs) and sex hormone concentrations in ringed and grey seals: a possible link to endocrine disruption? *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 78(4), 513–524. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00716-z>
58. Vanden Berghe, Marie, et al. "Relationships between Vitamin A and PCBs in Grey Seal Mothers and Pups during Lactation." *Environmental Pollution*, vol. 158, no. 5, May 2010, pp. 1570–75. *ScienceDirect*, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.12.012>.
59. Weitzman, Jenny, et al. "Factors Influencing and Consequences of Breeding Dispersal and Habitat Choice in Female Grey Seals (*Halichoerus Grypus*) on Sable Island, Nova Scotia." *Oecologia*, vol. 183, no. 2, Feb. 2017, pp. 367–78. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1007/s00442-016-3764-5>.
60. Westphal, Klemens, Reif, Van Neer, & Dähne, (2023). First evidence of grey seal predation on marine mammals in the German Baltic Sea. *Journal of Sea Research*, 192, 102350. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2023.102350>
61. Winsnes, C. (2023, July 31). Grey seal - NAMMCO. NAMMCO. <https://nammco.no/grey-seal/>
62. Zhang, Yang, Han, Lu, Wang, Tian, & Wang, (2014). Serum testosterone, progesterone, and estradiol concentrations and sexual maturation in spotted seals (*Phoca largha*). *Theriogenology*, 82(3), 475-480.e4. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.05.013>
63. Zimmer, Montaña, Olsaker, Dahl, Berg, Karlsson, Murk, Skaare, Ropstad, & Verhaegen, (2011). In vitro steroidogenic effects of mixtures of persistent organic pollutants (POPs) extracted from burbot (*Lota lota*) caught in two Norwegian lakes. *Science of the Total Environment*, 409(11), 2040–2048. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.055>

Priedas 1

Duomenys surinkti Estijoje. Tirtų ruonių 2024-2025 metais jauniklių duomenys. Vietovė- vieta, kurioje surinkti mėginiai, ID- priskiriamas numeris kuriuo individo mėginiai bus identifikuojami, lytis – M- vyras, F- moteris, stadija (1-5 stadija), atjunkymo stadija (weaner- atjunktas, pup- jauniklis, kuris dar yra žindomas motinos) ir svoris kilogramais pateikti lentelėje

Vietovė	ID	Gyvūnas	Lytis	Stadija	Kūno	Vietovė	ID	Gyvūnas	Lytis	Stadija	Kūno
	Nr				svoris		Nr				svoris
Innarahu	26	Weaner	M	5	45.8	Hijuma	51	Weaner	F	5	40
Innarahu	27	Weaner	F	5	37	Hijuma	52	Pup	F	3	15
Innarahu	28	Weaner	M	5	34.2	Hijuma	53	Pup	F	2	16
Innarahu	29	Pup	F	3	31.5	Alirahu	54	Weaner	M	5	45
Innarahu	30	Weaner	M	4	45.1	Alirahu	55	Pup	F	2	20
Innarahu	31	Pup	F	3	32.75	Alirahu	56	Pup	M	3	32
Innarahu	32	Weaner	M	4	33.35	Alirahu	57	Weaner	F	4	50
Innarahu	33	Weaner	F	5	40.1	Alirahu	58	Pup	F	3	19
Innarahu	34	Weaner	F	4	41	Alirahu	59	Weaner	M	4	57
Innarahu	35	Weaner	M	5	33.45	Innarahu	60	Pup	M	3	29
Innarahu	36	Pup	F	4	32.65	Innarahu	61	Pup	M	3	31
Innarahu	37	Pup	M	4	40.2	Innarahu	62	Weaner	M	5	47
Innarahu	38	Pup	F	3	36.3	Innarahu	63	Pup	F	3	35
Innarahu	39	Pup	M	3	27.6	Innarahu	64	Weaner	M	5	45
Innarahu	40	Pup	F	3	36.1	Innarahu	65	Weaner	F	5	45
Innarahu	41	Weaner	F	5	28.68	Innarahu	66	Pup	M	3	19
Innarahu	42	Weaner	M	5	33.7	Innarahu	67	Pup	F	2	19
Innarahu	43	Pup	F	4	31.7	Innarahu	68	Weaner	F	4	33
Innarahu	44	Weaner	M	4	36.4	Innarahu	69	Pup	M	2	15
Innarahu	45	Weaner	M	5	39	Vestikumaa	70	Pup	M	3	36
Hijuma	46	Pup	M	3	39.4	Vestikumaa	71	Weaner	F	4	29
Hijuma	47	Weaner	M	4	49.4	Vestikumaa	72	Pup	F	3	23
Hijuma	48	Pup	M	3	27	Vestikumaa	73	Weaner	M	4	41

Hijuma	49	Pup	F	2	14	Vestikumaa	74	Pup	F	3	22
Hijuma	50	Pup	F	3	34	Vestikumaa	75	Pup	M	2	15
						Vestikumaa	76	Pup	M	3	21