

**СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА НИВАТА НА ХОРМОНИТЕ 17 β -ЕСТРАДИОЛ И
ТЕСТОСТЕРОН ПРИ ИНБРЕДНИ И АУТБРЕДНИ ДОМАШНИ ЗАЙЦИ
(ORYCTOLAGUS CUNICULUS)**

Светлин Танчев, Деяна Христова, Владимир Петров, Станимир Димитров, Георги Бонев
Тракийски университет, 6000 Стара Загора

**COMPARATIVE ANALYSIS OF 17 β -ESTRADIOL AND TESTOSTERONE LEVEL IN
INBREED AND OUTBREED RABBITS (ORYCTOLAGUS CUNICULUS)**

Svetlin Tanchev, Deyana Hristova, Vladimir Petrov, Stanimir Dimitrov, George Bonev
Trakia University, 6000 Stara Zagora, Bulgaria

e-mail: dhristova@uni-sz.bg

ABSTRACT

A comparative analysis of blood hormonal levels of 17 β -estradiol and testosterone in inbred and outbred rabbits was performed. The animals were divided into the following groups: Group I – 10 male and 12 female outbred rabbits /Fx = 0/, Group II – 6 male and 10 female inbred rabbits /Fx = 0.25/, Group III – 9 male and 12 female inbred rabbits /Fx=0.375/. Inbred rabbits were result of experimental inbreeding through mating full sibs (brothers and sisters). The results demonstrated that inbreeding had a statistically significant negative effect only on blood testosterone concentrations in male rabbits. No substantial effect of inbreeding on blood 17 β -estradiol in females was noticed although its average values in inbred groups were lower as compared to those in the outbred group.

Key words: inbreeding, inbreeding depression, 17 β -estradiol, testosterone, rabbits

Въведение

Много изследвания показват, че повишаването на степента на инбридинг в животинските популации води до редица вредни последствия. Приема се, че това се дължи на повишаване на хомозиготните алели и намаляване на хетерозиготните локуси при животните продукт на инбридинг, което засяга негативно някои важни функции в живия организъм и предизвиква появата на инbredна депресия (Falconer and Mackey, 1996). Доказано е, че репродуктивните способности на животните са най-чувствителни към негативното влияние на инbredната депресия. Поддържането на нормален репродуктивен процес е от важно значение както за съществуването на популациите, както и на вида като цяло. В този смисъл редица изследвания показват, че увеличаването на степента на инбридинг води до гонадална хипоплазия и намаляване на *libido sexualis* при мъжките животни (Hradecky et al., 1985; Moura et al., 2001; Ala-Honkola et al., 2013), хистологични нарушения в тестисите и нивото на спермопродукцията (Krzanowska, 1962; Ford, 1970; Lasley, 1982, Oettle, 1993; Gage, 2006; Van Eldik et al., 2006; Tanchev, 2006; Asa et al., 2007; Georgieva et al., 2008; Fitzpatrick and Evans, 2009; Gomendio et al., 2010; Tanchev et al., 2012; Ala-Honkola et al., 2013; Baeshen et al., 2014), намаляване степента на овулация (Falconer and Roberts, 1960; Jawriska, 1988; Bezdicek et al., 2014), понижаване на заплодяемостта и плодовитостта на женските животни (Chai, 1969; Hinkovski et al., 1975; Poujardieu and Toure, 1980; Hradecky et al., 1985; Gerash, 1986; Toro et al., 1988; Park et al., 1990; Ferraz et al., 1992; Bielanski et al., 1993; Rodriganez et al., 1998; Culbertson et al., 1998; Farghaly, 2000; Tanchev, 2006; Falconer and Mackey, 1996; Bouzat et al., 1998; Westermeier et al., 1998; Meagher et al., 2000; Robert et al., 2005; Browun et al., 2009; Demontis et al., 2011; Johnson et al., 2011).

Сравнително малко и понякога разнопосочни са изследванията, свързани с влиянието на

инбридинга върху синтезата на половите хормони при различни видове животни (O' Brein, 1994; Kosowska and Zdrojewiez, 1996; Bickley et al., 2013).

Това определи насоката на нашето изследване, с което си поставихме за цел да направим сравнителен анализ на нивата на половите хормони 17β -естрадиол и тестостерон при инбредни и аутбредни домашни зайци.

Материал и методи

В проучването бяха включени общо 59 броя зайци от породата Бял новозеландски заек на възраст от 8 до 12 месеца, като разпределението по групи в зависимост от степента на инбридинг и пол е както следва:

- *Мъжки индивиди*: $F_x = 0 \rightarrow 10$ броя; $F_x = 0,25 \rightarrow 6$ броя; $F_x = 0,375 \rightarrow 9$ броя
- *Женски индивиди*: $F_x = 0 \rightarrow 12$ броя; $F_x = 0,25 \rightarrow 10$ броя; $F_x = 0,375 \rightarrow 12$ броя

Инбредните животни бяха получени чрез експериментален инбридинг по схемата на съешаване на пълни сибси (брат и сестри).

От всяко животно беше получено по 5 мл. кръв чрез пункция на ушната вена в съответствие с изискванията за благополучие на животните. Количественото определяне в кръвния серум на 17β -естрадиола (pmol/l) беше извършено с тест E-2-RIA-CT (Henny, 1986) и на тестостерона (ng/ml) с тест TESTO-RIA-CT (Holdunia and Walter, 1992) с китове на фирма BIOSOURCE (Белгия).

Силата на влияние на проучваните фактори беше определена по метода на еднофакторен дисперсионен анализ чрез адитивен модел с фиксирани ефекти-ANOVA. Статистически значимо влияние на изследвания фактор отчитаме при критично ниво от $p < 0,05$.

Биометричната обработка на резултатите беше извършена с помощта на статистическия пакет STATISTICA на фирмата StatSoft. Inc.

Резултати

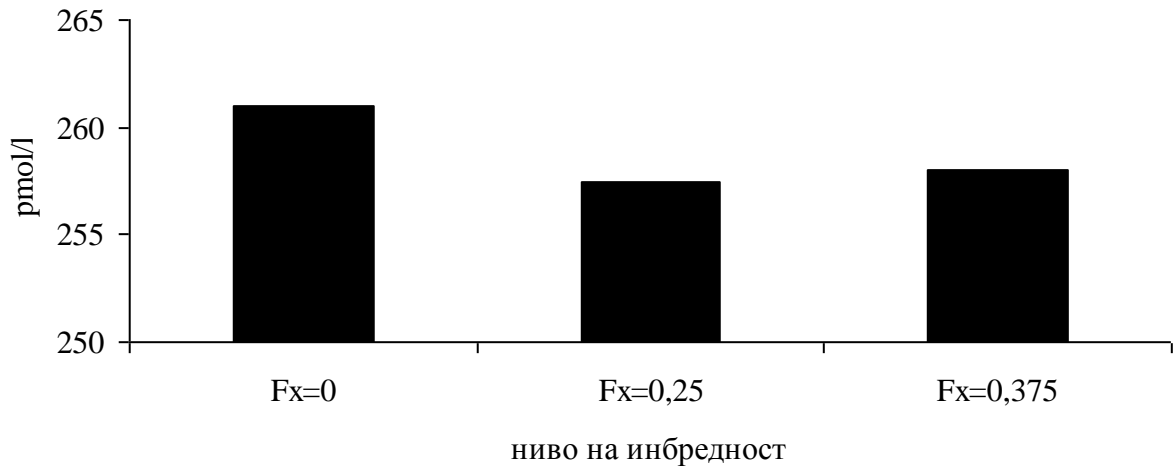
Анализът на вариансата характеризиращ влиянието на степента на инбридинг върху нивата на половите хормони 17β -естрадиол и тестостерон при бели новозеландски зайци е представен в Таблица 1. Получените резултати показват, че степента на инбридинг оказва статистически значимо влияние само върху нивата на хормона тестостерон при мъжките зайци.

На фигура 1 са представени средните стойности на хормона 17β -естрадиол при женските зайци по групи в зависимост от степента на инбридинг. В началото се наблюдава понижаване на нивото на хормона от групата на аутбредните животни към инбредната група $F_x=0,25$, след което при следващото инбредно ниво $F_x=0,375$ е налице слабо увеличаване на средната хормонална стойност. В случая нивото на хормона 17β -естрадиол при третата група незначително превишава това при зайките от групата със степен на инбридинг $F_x=0,25$. Независимо от това разликите между средните стойности на хормоналните нива са математически недостоверни.

Таблица 1. Влияние на фактора степен на инбридинг върху нивото на половите хормони 17 β -естрадиол и тестостерон

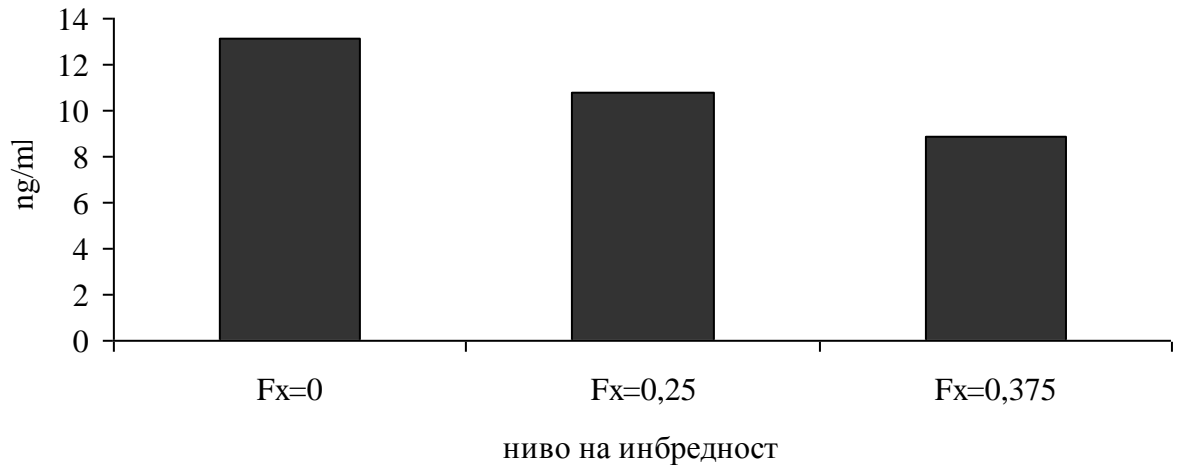
Признаци	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
Естрадиол при женски зайци	1330,591	2	665,2955	10597,01	32	331,1565	2,00901	.150690
Естрадиол при мъжки зайци	22,41	2	11,2051	10094,33	24	420,5971	0,02664	973740
Тестостерон при мъжки зайци	103,405*	2*	51.7025*	12.12*	24*	5.0050*	10.33015*	.000580*
Тестостерон при женски зайци	0,627	2	0,3134	6,33	33	0,1917	1,63458	.210433

* статистически значимо влияние



Фигура 1. Стойности на 17 β -естрадиол при женски зайци в зависимост от инбредното ниво

На фигура 2 са представени средните стойности на хормона тестостерон по групи в зависимост от нивото на инбридинг. От графиката е видно, че хормонално ниво е най-високо при аутбредните мъжки животни, следва групата на зайците със степен на инбридинг Fx=0,25, а с най-ниско средно ниво на тестостерон са животните от инбредната група Fx=0,375. Установените разлики между средните стойности на тестостерона при групата аутбредни зайци и тези на двете инбредни групи зайци (Fx=0,25 и Fx= 0,375) са статистически доказани в полза на аутбредните животни.



Фигура 2. Стойности на тестостерона при мъжки зайци в зависимост от инбредното ниво

Обсъждане

По отношение на хормона 17- β естрадиол при женските животни с увеличаване степента на инбридинг се наблюдава леко понижаване на хормоналните нива, но разликите между групите са статистически недостоверни. Това дава основание да се приеме хипотезата, че инбридинга не оказва значимо негативно влияние върху хормона 17 β -естрадиол при женските инбредни животни. Подобни резултати при изследване на влиянието на инбридинга върху женските полови хормона (вкл. 17 β -естрадиол) при свине са получили Howard et al., 1982, като авторите изказват становището, че не се наблюдава инбредна депресия върху синтеза на изследваните полови хормони при женските инбредни животни.

Прилагането на дисперсионен анализ и сравнителните графики показват, че увеличаването на степента на инбридинг води до статистически значимо намаляване на нивото на тестостерона при мъжките животни. Това е логично и закономерно още повече, че в процеса на експеримента с увеличаване на инбредното ниво се наблюдаваше увеличаване на броя на мъжките животни с намалено *libido sexualis*. Въз основа на горепосоченото може да се приеме, че повишаването на степента на инбридинг води до намаляване на нивото на тестостерон при мъжките животни, а от там до влошаване на репродуктивните им функции. В предишно наше изследване (Tanchev, 2006) беше установено, че увеличаването на степента на инбридинг при зайци води до статистически значимо намаляване на теглото на тестисите, намаляване на диаметъра на навитите семенни каналчета, понижаване на подвижността на сперматозоидите и увеличаване на броя на сперматозоидите с морфологични нарушения. Свързвайки тези данни представени в настоящото проучване, както и с резултатите на други автори може да се приеме, че инбредната депресия води до понижаване на нивата на тестостерон при мъжките инбредни животни, а това може да бъде причина за намаляване на размера на тестисите и негативните промени в диаметъра на семенните каналчета (Malo et al., 2009). От друга страна, високите нива на тестостерона и другите андрогени играят важна положителна роля при създаване на сперматозоидите (Setty, 1979; Robaire and Henderson, 2006, Henderson et al., 2006). Не на последно място може да се отбележи, че ниските андрогенни нива са свързани с негативни

промени в морфологията и подвижността на сперматозоидите (Robaire and Henderson, 2006; Malo et al. 2010).

Изводи

Увеличаването на степента на инбридинг до $F_x=0,375$ води до леко понижаване на нивото на хормона 17- β естрадиол при женските животни, но разликите между групите са статистически недостоверни.

Увеличаването на степента на инбридинг до $F_x=0,375$ води до статистически значимо намаляване на нивото на тестостерона при мъжките животни. Всичко това дава основание да се приеме, че инбредната депресия играе негативна роля при синтезата на хормона тестостерон, който е свързан с качеството на спермата и репродуктивните способности на мъжките инбредни зайци.

Литература

1. Ala-Honkola, O., Hosken, D., Manier, M., Lüpold, S., Droge-Young, E., Berben, K., Collins, W., Belote, J. and Pitnick, S. Inbreeding reveals mode of past selection on male reproductive characters in *Drosophila melanogaster*. *Ecology and Evolution*, 3 (7): 2089–2102, 2013.
2. Ala-Honkola, O., Manier, K., Lüpold, S., Pitnick, S. No evidence for postcopulatory inbreeding avoidance in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 65: 2699–2705, 2013.
3. Asa C., Miller P., Agnew M., Rebolledo J.A.R., Lindsey S.L., Callahan M., Bauman K., Relationship of inbreeding with sperm quality and reproductive success in Mexican gray wolves. *Anim. Cons.*, 10: 326–331, 2007.
4. Baeshen, R., Ekechukwu, N., Toure, M., Paton, D., Coulibaly, M., Traoré, S., Tripet, F. Differential effects of inbreeding and selection on male reproductive phenotype associated with the colonization and laboratory maintenance of *Anopheles gambiae*, *Malar J.*, 13-19, 2014.
5. Bezdíček, J., Stádník, L., Makarevich, A., Kubovičová, E., Louda, F., Hegedúšová, Z., Holásek, R., Beran, J., Nejdlová, M. Effect of inbreeding on yield and quality of embryos recovered from superovulated Holstein cows. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 38: 681–685, 2014.
6. Bickley, L., Brown, A., Hosken, D., Hamilton, P., Page, G., Paull, G., Owen, S., Tyler, C. Interactive effects of inbreeding and endocrine disruption on reproduction in a model laboratory fish. *Evolutionary Applications*, 6 (2): 279-289, 2013.
7. Bielanski, P., Fijal, I., Niedzwiadek, S. The influence of the inbreeding level on the indices of reproduction and meat production utility in rabbits, *J. Appl. Rabbit Res.*, 15: 308-313, 1993.
8. Bouzat, J., Lewin, H., Paige, K. The ghost of genetic diversity past: historical DNA analysis of the greater prairie chicken. *American Naturalist*, 152:1–6, 1998.
9. Brown, A., Hosken, D., Balloux, F., Bickley, L., LePage G., Owen, S., Hetheridge, M. Genetic variation, inbreeding and chemical exposure - combined effects in wildlife and critical considerations for ecotoxicology. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, B 364: 3377–3390, 2009.
10. Chai, C. Effect of inbreeding in rabbits, discrete characters, breeding performance and mortality, *J. Hered.*, 2: 64-70, 1969.
11. Culbertson, M., Mabry, J., Misztal, I., Gengler, N., Bertrand, J., Varona, L. Estimation of dominance variance in purebred Yorkshire swine, *J. Anim. Sci.*, 76, 2: 448-451, 1998.
12. Demontis, D., Pertoldi, C., Loeschcke, V., Mikkelsen, K., Axelsson, T., Kristensen, T. Efficiency

- of selection, as measured by single nucleotide polymorphism variation, is dependent on inbreeding rate in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology*, 18:4551–4563, 2009.
13. Falconer, D., Roberts R. Effect of inbreeding on ovulation rate and foetal mortality in mice, Agricultural Research Council Unit of Animal Genetics, Institute of Animal Genetics, Edinburgh, 9, 1960.
 14. Farghaly, H., 2000. Effects of inbreeding on doe's performance traits in closed commercial rabbit populations in Egypt. In: 7th World Rabbit Congress, Valencia, 39–43.
 15. Ferraz, J., Johnson, R., Van Vleck, L. Use of animal models to estimate the effects of inbreeding on growth and carcass traits of rabbits. *J. Appl. Rabbit Res.*, 15: 143-157, 1992.
 16. Fitzpatrick, J., Evans, J. Reduced heterozygosity impairs sperm quality in endangered mammals. *Biol. Lett.*, 5: 320–323, 2009.
 17. Ford, L. Comparison of testicular maturation in two inbred rabbit lines. *Amer. J. Vet. Res.*, 31, (5): 941-945.
 18. Gage, M., SurrIDGE, A., Tomkins, J., Green, E., Wiskin, L., Bell, D. Reduced heterozygosity depresses sperm quality in wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*. *Current Biology*, 16: 612–617, 2006.
 19. Georgieva, S., Tanchev, S., Penchev, G., Oblakova, M., 2008. Effect of inbreeding on reproduction traits of male rabbits, In: [Union of Scientists, Stara Zagora \(Bg\)](#).
 20. Gerash, G. Reproduction rearing performance of an inbred German Yorkshire population. *Anim. Breed.*, 54, 7933, 1986.
 21. Gomendio, M., Cassinello, J., Roldan E., 2000. A comparative study of ejaculate traits in three endangered ungulates with different levels of inbreeding: fluctuating asymmetry as an indicator of reproductive and genetic stress. In: *Proc. R. Soc. London B* 267, 875–882
 22. Henderson, N., Cooke, G., Robaire, B. Region-specific expression of androgen and growth factor pathway genes in the rat epididymis and the effects of dual 5alpha-reductase inhibition. *J Endocrinology*, 190:779– 791, 2006.
 23. Henny, A. Diagnosis of luteinized unruptured follicle by ultrasound and steroid hormone assays in peritoneal fluid: a comparative study. *Fert. and Steril.*, 46 (5): 823-827, 1986.
 24. Holdunia, P., Walter, C. A clinical evaluation of a direct radioimmunoassay of testosterone. *Clin. Chim. Acta*, 214: 31-43, 1992.
 25. Howard, P., Chakraborty, P., Camp, J., Stuart, L., Wildt D. Correlates of ovarian morphology, estrous behavior, and cyclicity in an inbred strain of miniature swine. *Anat. Rec.*, 203 (1): 55-65, 1982.
 26. Hradecky, J., Hruban. V., Hojnj, J. Pazdera. J., Stanek. R. Development of a semi-inbred line of Landrace pigs. I. Breeding performance and immunogenetic characteristics. *Lab. Anim.*, 19 (4): 279-283, 1985.
 27. Hinkovski, T., Vassileva, Y., Venev, I., 1975. *Genetic Basics of Selection of Farm Animals*, Zemizdat, Sofia (Bg).
 28. Jawriška, M., 1988. Influence of Inbreeding to the potential fertility in rabbits, In: *Proceedings of 4th World Rabbit Congress*, Budapest
 29. Johnson, T, Niimura, Y., Tanaka, H, Nakamura, Y., Tsunoda, T. hzAnalyzer: detection, quantification, and visualization of contiguous homozygosity in high-density genotyping datasets. *Genome Biol* 12: R21, 2011.
 30. Kosowska, B., Zdrojewicz, Z. Relationship between inbreeding and sex hormone concentration in

- rats under stress. II. The influence of various inbreeding levels on steroid sex hormone concentrations in two types of stress. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 113 (1-6): 135-143, 1996.
31. Krzanowska, H. Sperm quality and quantity in inbred lines of mice and their crosses. *Acta biol. Kracov. (Ser. Zool.)*, (5): 279-290, 1962.
 32. Lasley, J, 1982. Genetic base of animal selection, Kolos, Moscow (Ru).
 33. Meagher, S., Penn, D., Potts, W., 2000. Male-male competition magnifies inbreeding depression in wild house mice. In: *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 97: 3324–3329
 34. Malo, A., Roldan, E., Garde, J., Soler, A, Vicente, J., Gortazar, C., Gomendio, M., 2009. What does testosterone do for red deer males? In: *Proc R Soc. London B, Biol Sci.*, 276:971–980.
 35. Malo, A., Martinez-Pastor, F., Alaks, G., Dubach, J., Lacy, R. Effects of genetic captive-breeding protocols on sperm quality and fertility in the white-footed mouse. *Biol Reprod.*, 83 (4): 540-548, 2010.
 36. Moura, A., Costa, A., Polastre, R. Variance components and response to selection for reproductive, litter and growth traits through a multi-purpose index. *World Rabbit Sci.*, 9: 77-86, 2001.
 37. O'Brien, S. The cheetah's conservation controversy. *Conserv. Biology*, 8: 1153–1155, 1994.
 38. Oettle, E. Sperm morphology and fertility in the dog. *J. Reprod. Fertil.*, 1993:257–260, 1993.
 39. Park, Y., Hong, S., Kim, J., Kim, N. A study on the effect of inbreeding on the performance of Angora rabbits. *Korean J. Anim. Sci.*, (32): 459-463, 1990.
 40. Poujardieu, B., Toure, S., 1980. Influence de la variation du taux de consanguinite sur les performance d'elevage de lapines utilisees en croisement de souches. In: *Proceedings of II World Rabbit Congress, Spain, vol. I*, 223-227.
 41. Robaire, B., Henderson, N. Actions of 5 alpha-reductase inhibitors on the epididymis. *Mol Cell Endocrinology*, 250:190–195, 2006.
 42. Robert, A., Couvet, D., Sarrazin, F. Inbreeding effects on pair fecundity and population persistence. *Biological Journal of the Linnean Society*, 86: 467-476, 2005.
 43. Rodriganez, J., Toro, M., Rodriguez, M., Silio L. Effect of founder allele survival and inbreeding depression on litter size in a closed line of Large White pigs. *Animal Science*, 67: 573–582, 1998.
 44. Setty, B. Regulation of epididymal function and sperm maturation, endocrine approach to fertility control in male. *Endokrinologie*, 74: 100–117, 1979.
 45. Tanchev, S., Georgieva, S., Penchev, G., Tanchev, E., Dimitrov, S., Popov, B., Hristova D. Influence of inbreeding on boars testicular development and histostructure *J. Animal science*, 5: 38-43, 2012 (Bg).
 46. Tanchev, S., 2006. Experimental studies on some phenotype and genetic effects of inbreeding in multiparous mammals (*Oryctolagus cuniculus: Sus scrofa scrofa domestica*), DSc thesis (Bg) .
 47. Toro, M., Nieto, B., Salgado, C. Note on minimization of inbreeding in small-scale selection programmes. *Livestock Prod. Sci.*, 20, (4): 317-323, 1988.
 48. Van Eldik, P., Van DerWaaij, E., Ducro, B., Kooper, A., Stout, T., Colenbrander, B. Possible negative effects of inbreeding on semen quality in Shetland pony stallions. *Theriogenology*, 65 (6): 1159–1170, 2006.
 49. Westemeier, R., Brawn, J., Simpson, S., Esker, T., Jansen, R., Walk, J., Kershner, E., Bouzat, J., Paige, K. Tracking the long term decline and recovery of an isolated population. *Science*, 282: 1695–1698, 1998.