

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

katedra

**Neinvazivní metody pro stanovení pohlaví a steroidních hormonů u
gibonů rodu *Nomascus***

doktorská disertační práce

Autor: Ing. Petra Bolechová

Školitel: prof. Ing. Luděk Bartoš, DrSc.

Školitel specialista: MVDr. Jana Doležalová, Ph.D

Praha 2 0 1 6

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem dizertační práci „Neinvazivní metody pro stanovení steroidních hormonů a pohlaví u gibbonů rodu *Nomascus*. Vnější a vnitřní faktory ovlivňující hormonální cyklus u gibbonů rodu *Nomascus*“ vypracovala samostatně pod vedením vedoucího dizertační práce a s použitím informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené dizertační práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 3.9.2016

.....

Ing. Petra Bolechová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala všem ošetřovatelům a kolegům ze zoologických zahrad uvedených v této práci, díky jejichž pomoci a podpoře mohla být tato práce uskutečněna a všem ostatním, kteří mě jakkoli podpořili při psaní této dizertační práce. Zejména pak děkuji svému školiteli prof. Ing. Lud'ku Bartošovi, DrSc., se kterým jsem měla možnost podrobně konzultovat výsledky práce a za poskytnutí pomoci při samotném vypracování. Dále patří mé velké poděkování moji externí školitelce MVDr. Janě Doležalové, Ph.D., bez jejího odborného vedení by nebyly získány veškeré výsledky, za umožnění spolupráce a zajištění pracovního zázemí na půdě VFU Brno. Poděkování za pomoc při zpracování práce dále patří Mgr. Evě Jánové, Ph.D., MVDr. Edwige Roux a MVDr. Michaele Korytářové. Děkuji také své rodině za trpělivost a podporu při mém studiu.

V neposlední řadě patří mé poděkování a vzpomínka doc. Ing. Lukáši Jebavému, CSc., díky němuž tato práce byla vůbec započata.

Obsah

1	Přehled literatury	1
1.1	Taxonomické zařazení gibbonů rodu <i>Nomascus</i> Miller 1923	1
1.2	Status vybraných druhů gibbonů rodu <i>Nomascus</i>	1
1.3	Charakteristika gibbonů rodu <i>Nomascus</i>	3
1.3.1	<i>Nomascus leucogenys</i>	4
1.3.2	<i>Nomascus siki</i>	5
1.3.3	<i>Nomascus gabriellae</i>	6
1.4	Sociální systém gibbonů	9
1.5	Reprodukční cyklus gibbonů rodu <i>Nomascus</i>	10
1.5.1	Ovariální cyklus	10
1.5.2	Délka ovariálního cyklu u gibbonů <i>Nomascus</i>	12
1.5.3	Puberta – nástup pohlavní dospělosti u gibbonů <i>Nomascus</i>	14
1.5.4	Březost u gibbonů <i>Nomascus</i>	16
1.6	Metabolismus steroidních hormonů	17
1.6.1	Syntéza steroidních hormonů	17
1.6.2	Degradace steroidních hormonů	19
1.6.3	Fytoestrogeny a jejich vliv na reprodukci	19
1.7	Metody používané ke sledování pohlavních hormonů	20
1.7.1	Neinvazivní metody používané ke stanovení pohlavních hormonů	20
1.7.2	Rychlost vylučování metabolitů hormonů	22
1.7.3	Využití neinvazivních metod v praxi	23
1.7.4	Neinvazivní metody u čeledi <i>Hylobatidae</i>	24
1.8	Vybraná neinvazivní metoda pro stanovení pohlavních hormonů	25
1.8.1	ELISA = EIA metoda – kompetitivní typ	25
1.8.2	Validace metodiky pro detekci hormonů z výkalů	27
1.8.2.1	Analytická validace	27
1.8.2.2	Biologická validace	28
1.9	Metody používané ke stanovení pohlaví	29
1.9.1	Stanovení pohlavních hormonů	29
1.9.2	PCR – neinvazivní metoda DNA analýzy	30

2	Cíle práce.....	32
2.1	Determinace pohlaví.....	32
2.2	Stanovení steroidních hormonů a faktorů ovlivňujících jejich cyklus.....	32
3	Materiál a metodika.....	33
3.1	Frekvence odběru vzorků a identifikace zvířete.....	33
3.1.1	Informace o krmné dávce gibbonů.....	35
3.2	Metodika PCR analýzy.....	35
3.3	Metodika EIA analýzy.....	36
3.3.1	Extrakce metabolitů hormonů.....	36
3.3.2	ELISA.....	36
3.3.2.1	Stanovení vhodné koncentrace konjugátů a protilátek.....	36
3.3.2.2	Ředění protilátek a konjugátů.....	37
3.3.2.3	Příprava standardů steroidů.....	38
3.3.2.4	Potažení mikrotitrační destičky (MTP) protilátkami a konjugáty.....	38
3.3.2.5	Zastavení barevné reakce.....	39
3.3.2.6	Výsledky analýz – spektrofotometrické čtení MTP.....	39
3.4	Statistické analýzy.....	40
3.4.1	Vliv pohlaví, druhu a prostředí na výši koncentrace hormonů.....	41
3.4.2	Vliv březosti na koncentraci hormonů u samice a samce.....	41
3.4.3	Koncentrace hormonů ovlivněné složením skupiny.....	41
4	Výsledky.....	42
4.1	Stanovení pohlaví pomocí PCR analýzy.....	42
4.2	ELISA – analýza koncentrace steroidních hormonů.....	44
4.2.1	Vliv pohlaví, druhu a prostředí na výši koncentrace hormonů.....	44
4.2.2	Délka ovulačního cyklu u dospělých samic.....	46
4.2.3	Stanovení březosti u samic a výpočet výše koncentrace hormonů, vliv březosti samice na koncentraci hormonů u samce.....	47
4.2.4	Koncentrace hormonů u novorozence.....	53
4.2.5	Koncentrace hormonů u gibbonů s antikoncepcí.....	53
4.2.6	Hodnoty koncentrace hormonů ovlivněné složením skupiny.....	55
4.2.7	Nástup pohlavní dospělosti u samic a změna barvy srsti.....	56
5	Diskuze.....	58
5.1	Stanovení pohlaví u gibbonů rodu <i>Nomascus</i>	58

5.2	Stanovení steroidních hormonů u gibbonů rodu <i>Nomascus</i> a faktory ovlivňující jejich cyklus.....	59
6	Závěry a doporučení.....	65
6.1	Doporučení pro management chovu gibbonů rodu <i>Nomascus</i>	65
7	Grantová podpora.....	66
8	Seznam použité literatury - References.....	67
9	Přílohy.....	87

Použité zkratky:

ACTH – adrenokortikotropní hormon (ang. adrenocorticotropic hormone)

BSA – bovinní sérový albumin (ang. bovine serum albumin)

bp – pár bází (ang. base pair)

DNA – deoxyribonukleová kyselina (ang. deoxyribonucleic acid)

E - estradiol 17 β

EAZA – Evropská asociace zoologických zahrad a akvárií (ang. European association of zoos and aquaria)

EEP – Evropský záchranný program pro ohrožené druhy (ang. European Endangered Species Programme)

EIA – enzymatický test (ang. enzymatic immunoassay)

ELISA – enzymově značený test s využitím pevné fáze (ang. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

FSH – folikulostimulační hormon (ang. follicle-stimulating hormone)

GnRhH – gonadotropiny uvolňující hormon (ang. gonadotropin-releasing hormone)

HPA – hypothalamo-hypofyzární-adrenální osa (ang. hypothalamic-pituitary-adrenal axis)

HPG – hypothalamo- hypofyzární – gonadální osa (ang. hypothalamic-pituitary-gonadal axis)

HRP – křenová peroxidáza (ang. horseradish peroxidase)

IUCN Red List – Červená kniha Mezinárodního svazu ochrany přírody (ang. Red List of International Union for Conservation Nature)

LH – luteinizační hormon (ang. luteinizing hormone)

M – molární koncentrace (1mol/L) (ang. molarity)

MTP – mikrotitrační destička (ang. microtiter plate)

OC – ovariální cyklus (ang. ovarian cycle)

PCR – polymerázová řetězová reakce (ang. polymerase chain reaction)

Pdg – pregnadiol-3-glucuronid

RIA – radioimunologický test (ang. radioimmunoassay)

SHBG – sexuální hormony vázající globulin (ang. sex hormone binding globulin)

ABSTRAKT

Giboni rodu *Nomascus* patří ke kriticky ohroženému druhu, o kterém zároveň chybí velké množství základních biologických informací. Vzhledem ke statutu těchto zvířat ve volné přírodě i počtu chovaných jedinců v chovu zoologických zahrad je prioritní otázkou zlepšení managementu chovu, kam patří i znalost reprodukce. Základním cílem této práce je praktické využití neinvazivních metod (polymerázová řetězová reakce k extrakci DNA a enzymové imunotesty), využívajících k analýzám vzorky výkalů. První metoda, polymerázová řetězová reakce, byla využita pro determinaci pohlaví u mláďat, protože kvůli jejich specifickému zbarvení a vzhledové podobnosti vnějších pohlavních orgánů, není diagnostika možná bez odchycení zvířete. Další částí je zodpovězení hypotéz týkajících se ovariálního cyklu samic a faktorů ovlivňujících jejich koncentrace včetně souvislosti nástupu pohlavního cyklu u samic a jejich změny barvy srsti. Hypotézy byly ověřeny sledováním výše koncentrací metabolitů progesteronu a estrogeneru ve výkalech a vyhodnocením složení chovné skupiny gibbonů a vlivu ZOO. Celkem bylo analyzováno během čtyř let (2010-2014) 51 zvířat z 16 zoologických zahrad v celkovém množství 1618 vzorků výkalů. Výsledky potvrdily využití neinvazivních metod pro determinaci pohlaví a tak zajištění maximálního welfare v chovech. Endokrinologické analýzy potvrdily hypotézy o vlivu prostředí (ZOO) na koncentraci hormonů a vliv březosti samice a jejího věku na vyšší koncentrace hormonů, ale také vliv březosti na koncentraci hormonů u samců-otců. Prvotní informací v této studii je potvrzení nástupu ovariálního cyklu u mladých samic bez návaznosti na jejich přebarvení a významný faktor vlivu matky a její teritoriality. Tato studie předkládá první dlouhodobější monitoring ovariálního cyklu u samic a koncentrace hormonů u ostatních jedinců ve všech věkových kategoriích i pohlaví. Výsledky umožňují pochopit vliv chovatelského prostředí na reprodukční postavení těchto gibbonů a přispívají k celkovému zlepšení managementu chovu.

Klíčová slova: *Nomascus*, EIA, PCR, estrogen, progesteron, pohlaví, pohlavní dospělost, ovariální cyklus, barva srsti, vnější a vnitřní faktory prostředí

ABSTRACT

The gibbon primates of the family *Nomascus* are classified as critically endangered species, and, to date, basic understanding and information about their biology is missing. With regard to the status of these animals in the wild and captive populations in zoos, being familiar with their reproduction, may improve captive breeding programs. Data collection in this study was to be carried out by the practical use of non-invasive methods (polymerase chain reaction for DNA extraction and enzyme immunoassays), using faecal samples for analysis. The first method, polymerase chain reaction, was used for sex determination in juveniles, because of their coat colour and visual similarity of secondary sex characteristic in both sexes; it is not possible to determinate sex without handling the animal. Another main purpose of this study is to try and answer the hypothesis regarding the ovarian cycle of females, factors influencing their hormone concentration and also the onset of sexual maturity in females and the timing of their fur colour change. Hypotheses were checked by monitoring the concentration of progesterone and oestrogen faecal metabolites and by evaluation of the composition of breeding groups of gibbons with the ZOO influence. During a four year period (2010 – 2014), there were a total of 51 animals analysed from 16 different zoos with a faecal sample count totalling 1618 samples. The results confirmed the use of non-invasive methods for sex determination, and thus ensuring the maximum welfare standards. Endocrinological analysis confirmed the hypothesis of the influence of the environment (ZOO) to the hormone concentrations and female's pregnancy effect in conjunction with her age on the final results of the male - father hormone concentrations. The initial information in this study is the confirmation of the onset of ovarian cycle in young females without connection to their fur colour change and a significant factor of a mother's impact and her territoriality. This study is the first to present a long-term monitoring of ovarian cycles in females and hormone concentrations of other individuals, both male and female, and from various age groups. The results allow us to understand the possible impact of zoo environments on the reproductive status of these gibbons and contribute to the general improvement of breeding management.

Key words: *Nomascus*, EIA, PCR, oestrogen, progesterone, sex, sexual maturity, ovarian cycle, fur colour, intra and extra factors of environment

1 Přehled literatury

1.1. Taxonomické zařazení gibbonů rodu *Nomascus* Miller 1923

Řád: *Primates* Linné 1758 – primáti

Podřád: *Haplorrhini* Pocock 1918 - vyšší primáti

Infrařád: *Simiiformes* Haeckel 1866 - opice

Nadčeleď: *Hominoidea* Gray 1825 - lidoopi

Čeleď: *Hylobatidae* Gray 1870 - gibbonovití

Rod: 1/ *Hylobates* Illiger 1811- lar

2/ *Hoolock* Mootnick & Groves 2005 - hulok

3/ *Symphalangus* Raffles 1821 - siamang

4/ *Nomascus* Miller 1923 - gibon chocholatý

Druh: *Nomascus concolor* Harlan 1826 - gibon černý

Nomascus hainanus Thomas 1892 - gibon hainanský

Nomascus nasutus Kunkel-d'Herculis 1884 - gibon černochocholatý

Nomascus gabriellae Thomas 1909 - gibon žlutolící

Nomascus siki Delacour 1951 - gibon bělolící-jihní

Nomascus leucogenys Ogilby 1840 - gibon bělolící-severní (Geissmann, 2000).

1.2 Status vybraných gibbonů rodu *Nomascus*

Z čeledi *Hylobatidae* patří i v 21. století rod *Nomascus* mezi nejméně studované gibony ve volné přírodě a díky jejich striktně arboreálnímu způsobu života a typu terénu neexistují dostatečné informace o jejich historii, biologii a chování druhu (Lukas et al., 2002). Pouze jedna dlouhodobější studie o chování, sociální struktuře skupiny a potravě u gibona žlutolícího (*Nomascus gabriellae*) pochází z této doby (Kenyon, 2007).

Vzhledem k ochranářskému statusu gibbonů rodu *Nomascus* a množství jedinců chovaných v lidské péči (200 – 400 jedinců), a z toho vyplývajícím prioritnímu úkolu zlepšit chovné a případné ochranářské programy pro tento rod, je tato studie zaměřena na druhy *Nomascus leucogenys*, *N. siki* a *N. gabriellae* chovaných v rámci organizací EAZA (Evropská asociace zoologických zahrad a akvárií).

Status gibbonů *Nomascus* chovaných v rámci EAZA organizací uvádí plemenná kniha *European Studbook Number 9* (Tabulka č. 1) vydané koordinátorem EEP (Evropský záchranný program pro ohrožené druhy) pro rod *Nomascus*, dr. Bricem Lefauxem (ZOO Mulhouse). Stav těchto gibbonů v rámci EAZA organizací k 31.12.2013 jsou následující:

Tabulka č. 1 Stav gibbonů rodu *Nomascus* v rámci EAZA populací

EAZA populace	<i>Nomascus leucogenys</i>	<i>Nomascus siki</i>	<i>Nomascus gabriellae</i>
počet institucí	35	4	31
počet samců	48	4	61
počet samic	31	2	45
počet mláďat	5	2	25
počet gibbonů celkem	84	8	131

(Převzato: Lefaux, 2014)

Status *N. siki* je v chovných zařízeních dosti vážný i vzhledem k tomu, že se rozmnožuje pouze ve dvou zoologických zahradách (Mulhouse, Romange). Patrný je všeobecný trend zvýšeného poměru rodičích se mláďat samčího pohlaví, což v případě dlouhého reprodukčního cyklu nezlepšuje současnou chovatelskou situaci.

Giboni rodu *Nomascus* jsou všichni uváděni dle IUCN Red List (Bleisch et al., 2008; Geismann et al., 2008; Manh Ha et al., 2008) jako druh ve volné přírodě ohrožený (EN) – druh *N. gabriellae* a *N.siki* a kriticky ohrožený (CR) druh *N. leucogenys* a jak bylo uvedeno výše, populace chovaná v lidské péči se pohybuje v případě gibona bělolícího i zlatolícího okolo 100 jedinců (Geismann, 1995; Lernould, 1993; Moisson et Prieur, 2007; Lefaux, 2014).

Areál rozšíření gibbonů (*Hylobatidae*) ve volné přírodě zahrnuje lesy jihovýchodní Asie. Giboni „chocholatí“ (*N. gabriellae*, *N. siki* a *N. leucogenys*) jsou charakterističtí svojí krátkou hustou srstí a jejich původním habitatem je Vietnam, Kambodža, Laos a Čína (Mootnick, 2006).

Dle údajů IUCN Red List (Bleisch et al., 2008; Geismann et al., 2008; Manh Ha et al., 2008) se odhadují počty gibbonů *Nomascus gabriellae* na cca 500 jedinců v národním parku Cat Tien ve

Vietnamu, v Kambodži se odhaduje velikost populace na 1700 skupin, možná i více, z Laosu je údaj velmi rozptýlený - 400 – 6720 skupin. Na druhé straně *N. leucogenys* je považován v Číně od roku 1990 za vyhubený (Fan, 2016) a jeho počet v ostatních lokalitách se díky narušení jeho habitatu odhaduje na nižší, než je uváděn u předchozího druhu. Populace *N. siki* v Laosu není udávána a v národním parku Uha-Ka Bang ve Vietnamu je monitorováno 13 skupin.

1.3 Charakteristika gibonů rodu *Nomascus*

Jedinci rodu *Nomascus* mají výrazný pohlavní dimorfismus, který je rozlišitelný podle rozdílného zbarvení samců a samic až po nástupu tělesné dospělosti. Všichni mladí jedinci se rodí s béžovou srstí, která se v průběhu prvního roku mění na černou (Mootnick et Fan, 2011). Po dosažení tělesné dospělosti zůstává u samců srst černá, s bílou srstí na lících, samice jsou krémově až zlatavě zbarvené s černými tvářemi a tmavší či černou srstí na hlavě (Geissmann et al., 2000; Mootnick, 2006).

Podle Mootnicka (2006) mohou mít dospělé samice rodu *Nomascus* barvu chlupů modifikovanou až na oranžovou, v závislosti na stupni vlhkosti prostředí. Typickým znakem dospělých samic je černá chocholka nebo pruh na temeni hlavy lišící se ve velikosti a mohou mít také slabé nebo výrazné bílé nebo černé prstence na tváři dle druhu jednotlivého gibona (Mootnick, 2006).

V minulosti byly některé druhy tohoto rodu primátů centrem značných diskuzí díky jejich změnám barvy srsti během dospívání, i díky jiným faktorům, jako je fyzická podobnost genitálií u obou pohlaví, způsobující problémy s určením pohlaví jedince (Mootnick, 2006; Mootnick et Fan, 2011).

Samice rodu *Nomascus* mají totiž tvar klitorisu podobný samčímu penisu a membránu uzavírající pochvu (Dahl, 2015). Klitoris samice je velký téměř jako penis samce a také obsahuje pyjovou kost (*baculum*) (Geissmann et Lim, 1994).

1.3.1 *Nomascus leucogenys*

Současný areál rozšíření tohoto druhu gibona je Xishuangbanna, Jiangcheng, jižní Yunnan, severní Laos a severovýchodní Vietnam (Obr. č. 4).

Typická tvářová světlá maska u dospělých černě zbarvených samců a juvenilních mlád'at, se napojuje pod bradu a může zasahovat až k vrcholku uší. Dospělí samci mohou mít bílé chlupy okolo rtů. Všichni gibboni mají vyvinutý hrdelní vak, který používají k vokalizaci. Dospělí samci mají hrdelní vak o rozměrech v průměru 3 – 6 cm. Mladí samci nejsou ze začátku schopni tento vak zcela nafouknout, až s postupným dospíváním se ho učí při zpěvu (vokalizaci) využít naplno a postupně tak rozvíjejí „samčí“ zpěv. V raném věku (okolo 2 – 3 let) zpívají ze začátku všechna mlád'ata jako samice (Geissmann, 2000; Hradec et al., 2016).

Mlád'ata se rodí s hnědožlutou barvou srsti, změna barvy jejich srsti na černou začíná ve věku 6 měsíců a celkové přebarvení do černé barvy srsti trvá do 18 měsíců věku (Mootnick et Fan, 2011).

Mootnick et Fan (2011) dále uvádějí, že novorozená mlád'ata samčího pohlaví mají na hlavě „rozčepýřené chlupy“, které se mohou případně vyvinout v chochol. U novorozenců samičího pohlaví tento znak zaznamenán nebyl.

Okolo 67 dnů věku mláděte je možné poprvé zaznamenat stopu bílého „obočí“ u samic. Okolo 72 dnů věku se u nedospělých černých samic začínají měnit bílé chlupy na tvářích v hnědožlutou, což souvisí se začínající přeměnou, kdy je vidět postupně po celém těle mix žlutohnědých a černých chlupů a shoduje se s nástupem pohlavní dospělosti, jak uvádí Mootnick et Fan (2011), Obr. č. 1.

Podle revize Mootnicka et Fan (2011) je u samic ve věku 6 let a 7 měsíců srst prošedivělá, ramena a hlava žlutohnědá, stopy bílých chlupů okolo spodní čelisti a dobře definovaná korunka z černých chlupů. V 7 letech a 10 měsících jsou samice téměř žlutohnědé s více zřetelnými bílými chlupy okolo spodní čelisti a lehkou šedivou barvou na vnější straně paží. Samice přebarvují do žlutohnědé s bílým pruhem ve tváři v průměrném věku 8 let a 8 měsíců.

Dospělé samice se liší ve zbarvení srsti od tmavé do světle žlutohnědé nebo krémově oranžové, často s rozptýlenými bronzově žlutohnědými, šedivými nebo černými chlupy a bílým pruhem ve tváři, s více či méně bílými nebo černými chlupy pod očima a nad ústy. V závislosti na fyzické kondici nebo daném jedinci můžeme nalézt stopu bílých chlupů nad kořenem nosu, kde

se může rozšiřovat do hnědé barvy. Dospělé samice mají několik černých chlupů nad a za ušima a také na konečcích prstů. Ochlupení genitálií u dospělých samic se pohybuje v barvě od červeně hnědé, hnědavé, hnědo-černé až černé s černými chlupy okolo řitního otvoru (Mootnick et Fan, 2011), Obr. č. 1.

Obr. č. 1



Nomascus leucogenys – vlevo samice s 3. měsíčním mládětem, foto P. Vlček, ZOO Ostrava; vpravo subadultní 4. letý samec, uprostřed dospělý samec a vepředu 6. letá samice, foto Š. Šimoníková, ZOO Liberec.

1.3.2 *Nomascus siki*

Současný areál rozšíření tohoto druhu je severní a centrální část Vietnamu, východ od řeky Mekong, jižní Laos (Obr. č. 4).

Dospělí samci a mláďata v černé barvě srsti mají malé bílé skvrny ve tvářích, které se mohou rozpínat až k očním koutkům a mohou pokračovat až k uším. Mootnick et Fan (2011) popisuje případ jedné samice chované v ZOO Mulhouse, která měla žlutohnědé skvrny ve tvářích již od věku 18 měsíců do 4,8 let, Obr. č. 2.

Několik bílých chlupů částečně ohraničuje dokola rty s postupným rozšířením těchto chlupů směrem k dolnímu rtu, napojují se na horní část hrdla a končí v černě zbarvené bradě, která může být prorostlá bílými chlupy (Mootnick et Fan, 2011).

Dospělé samice druhu *N. siki* mají několik černých chlupů nad ušima a mají více podobných vizuálních charakteristik s dospělými samicemi *N. leucogenys* než s dospělými samicemi *N. gabriellae*. Samice druhu *N. siki* se vyznačují klasickým tenkým tvářovým pruhem, který se rozšiřuje nad ústy a pod očima, poté obkresluje oči a napojuje se na hnědou barvu u dospělých a starších samic (Mootnick et Fan, 2011), Obr. č. 2.

Obr. č. 2



Nomascus siki – vlevo dospělá samice a vpravo subadultní samice, foto M. Hradec, ZOO Mulhouse.

1.3.3 *Nomascus gabriellae*

Současný areál rozšíření tohoto druhu je jižní Vietnam, jižně od Bach Ma, jižní Laos a severovýchod Kambodže, jih provincie Ratanakari (Obr. č.4).

Dospělí samci jsou většinou černí s hnědavými oblastmi na hrudi v rozměrech 14cm na délku a 3cm na šířku a končící na začátku břicha, a mohou být světlejší barvy v okolí bradavek. Samci

mají malé, hnědavě bílé pruhy ve tváři, které se postupně rozšiřují až ke konci orbitálního hřebene a mohou se ojediněle vyskytovat až na začátek hrdla. Pod očima jsou chlupy černé a několik krémově bílých chlupů obklopuje rty (Mootnick et Fan, 2011).

Dospělé samice jsou většinou hnědožluté až červeně hnědožluté a občas mají mírně probarvenou hrud' tmavšími chlupy, které byly viditelné i na konečcích prstů, předloktí nebo na vnější straně předloktí. Jejich černý pruh na hlavě se zužuje směrem k týlu krku a občas se najdou rozptýlené černé chlupy od středové části lopatek. Pod očima mají černé chlupy a typickou stopu bílých okrajů ohraničujících tvář, s několika černými chlupy především na předních stranách a vrcholu uší (Mootnick et Fan, 2011), Obr. č. 3.

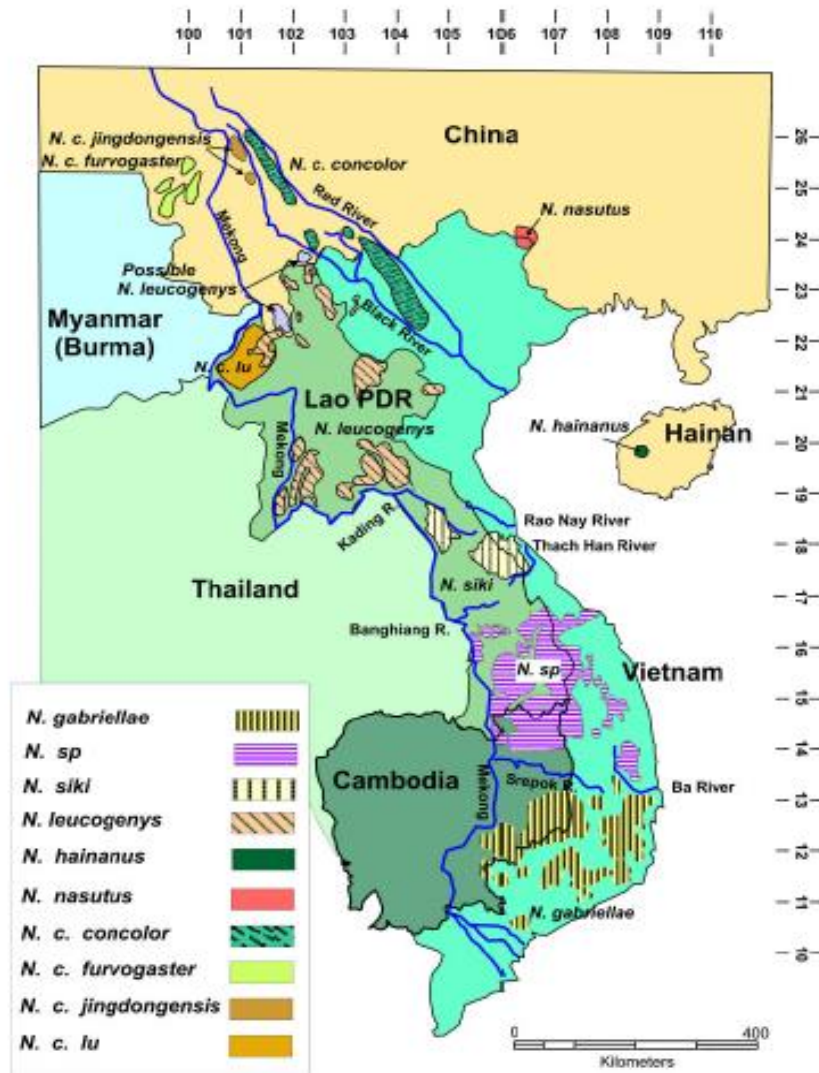
Dospělé samice mohou být zbarveny jemně červeně - hnědě, barva chlupů okolo genitálií je hnědo černá až černá, s několika jemně červeně - hnědě až černě zbarvenými chlupy okolo řitního otvoru (Mootnick et Fan, 2011).

Obr. č. 3



Nomascus gabriellae –březí samice a samice s 3,5 měsíčním mládětem, foto J. Vokurková, ZOO Olomouc.

Obr. č. 4 Geografické rozšíření gibbonů rodu *Nomascus*



Rozšíření jednotlivých druhů gibbonů dle M. Schwartze a N.Ambera, IUCN Red List (převzato: Mootnick et Fan, 2011).

1.4 Sociální systém gibbonů

Sociální systém u primátů můžeme rozlišit na 5 typů, podle toho, zda se samice páří obvykle jen s jedním samcem, nebo s více než jedním samcem během období říje, a zda je její sexuální vztah dlouhotrvající a relativně exkluzivní nebo krátkodobý, neexkluzivní (Dixson, 2012):

1. monogamie (jeden samec – jedna samice)
2. polygynie (jeden samec – více samic)
3. polyandrie (více samců – jedna samice)
4. polygamie (vícesamco-samičí uskupení)
5. rozptýlený nebo solitérní (vyhledávání partnera jen v době říje)

Gibonovití jsou považováni za monogamní druhy (Kleiman, 1977; Rubberg, 1983; Fuentes, 1999). Současné informace týkající se reprodukce tohoto taxonu jsou velmi omezené. Stavbou těla jsou samice gibbonů malé a jsou silně teritoriální. Samci jsou rozptýlení s ohledem na samice, což reprezentuje limitní zdroj reprodukčních možností. Nepřátelskost samic vůči ostatním samicím, spolu s nedostatkem samčí dominance, snad zabraňuje samcům socializaci s více samicemi a limituje sociální systém na monogamii více než polygynii (Dixson, 2012).

Avšak již první možnou variaci v sociálním systému u gibbonů popsal jako první Chivers (1972, 1976) u gibbonů siamangů (*Symphalangus syndactylus*) a larů (*Hylobates lar*). Zhou et al. (2008) ve své studii z volné přírody týkající se příbuzného druhu *Nomascus hainanus* uvádějí, že byl zjištěn polygynní systém (1 samec a 2 – 3 samice), s možným vlivem suboptimálních podmínek habitatu. Taktéž byla zjištěna polygynie i polyandrie u *Nomascus concolor* (Jiang et al., 1994, 1999a,b; Fuentes, 2000; Sommer et Reichard, 2000) oproti uváděné tradiční monogamii. Huan et al. (2013) popisuje polygynní systém u gibbonů *N. concolor* – intra a extra skupinové páření, kdy samice solcitovaly páření dle jejich výběru samce. Studie Barelli et al. (2007) z volné přírody popisuje samice gibbonů bělolících (*N. leogenys*) v monogamii i polygamii, také Kenyon et al. (2011) uvádějí případ extra párové kopulace u *N. gabriellae*.

Sociální systém gibbonovitých tak bude zřejmě mnohem dynamičtější, než byly původní představy a ovlivněný početními stavy gibbonů i degradací jejich původního habitatu (Zhou et al., 2008) a je schopen vysoké flexibility dle aktuálních změn v prostředí (Fuentes, 2000). Dostatek potravních zdrojů a jejich dostupnost v prostředí spolu s velikostí teritoria je zřejmě i

důsledkem možného vícesamičího uskupení nepříbuzných samic v jedné skupině gibbonů, jak uvádí Fan et al. (2010) ve své studii z Yunnanu v Číně u gibbonů *N. concolor*.

Fan et al. (2015) uvádí z lokality Bangliang v Číně pororování 3 skupin gibbonů se dvěmi samicemi v každé skupině, které se pravidelně rozmnožovaly a nebyla zaznamenána větší potravní kompetice uvnitř skupiny ani mezi samicemi, což je zřejmě výsledkem celoročně dostatečné potravní nabídky v této oblasti a schopnosti gibbonů přijímat poměrně velké množství folivorní potravy mimo období zrání ovoce.

1.5 Reprodukční cyklus gibbonů rodu *Nomascus*

Základními hormony souvisejícími s ovariálním cyklem, březostí a porodem jsou estrogény, progesteron a gonadotropiny (Saltzman et al., 2011).

Estrogény u samic savců jsou steroidy produkované vaječníky, placentou a kůrou nadledvin. Mezi převládající estrogény patří 17 β -estradiol, estron a estriol. Hlavní funkcí estrogenů je stimulovat buněčnou proliferaci a růst tkání, které mají vztah k reprodukci (Saltzman et al., 2011).

Progesteron je steroidní hormon produkovaný žlutým tělískem vaječníků, placentou a kůrou nadledvin. Během březosti se progesteron syntetizuje a secernuje v placentě i děloze. Fyziologicky nejúčinnější je progesteron syntetizovaný ve žlutém tělisku (Saltzman et al., 2011).

Gonadotropiny neboli folikulostimulační hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH) mají vliv na buňky vaječníků a varlat. FSH a LH jsou secernovány buňkami předního laloku hypofýzy. Hlavní funkcí FSH u samic je podněcování růstu folikulů. LH je důležitý pro ovulaci a luteinizaci granulózy neboli pro vznik žlutého tělíska (Norris, 2007; Saltzman et al., 2011).

Produkce hypofyzárních gonadotropinů podléhá hormonálnímu řízení z hypotalamu, kde je vylučován gonadotropin-releasing hormon (GnRH). Ten přímo působí na adenohipofýzu a upravuje tak hladinu vylučovaných gonadotropinů (Saltzman et al., 2011).

1.5.1 Ovariální cyklus

Ovariální neboli estrální cyklus označuje fyziologické změny pozorované na pohlavních orgánech a v chování samic. Tyto změny zahrnují pravidelné, ale omezené periody svolnosti

k páření, neboli období říje = estrus. Jeden interval cyklu je definován jako čas od začátku jednoho cyklu říje k dalšímu. Rytmus pohlavního cyklu je určován druhovou příslušností samice a existenčními podmínkami. Podle výskytu estrálního cyklu v jednom roce řadíme zvířata mezi monoestrická (říje jednou do roka), diestrická (dvě říje do roka) nebo polyestrická (více říjí za rok). Většinu primátů řadíme mezi polyestrické druhy (Dixson, 2012).

U estrálního cyklu rozlišujeme několik stádií podle chování a změn na vaječnicích (Saltzman et al., 2011):

1. Proestrus (období přípravy k říji) – perioda začínající po regresi žlutého tělíska a končící nástupem estru.
2. Estrus (období vlastní říje) – říje, doba sexuální ochoty
3. Metestrus (období po říji) – postovulační období, během kterého se začíná vyvíjet žluté tělísko
4. Diestrus (období mezi říjemi) – období plné luteální aktivity, které končí regresí žlutého tělíska.

Podle převažujícího vlivu hormonů v určité fázi lze estrální cyklus rozdělit na dvě fáze a to folikulární periodu, zahrnující proestrus a estrus, která je charakterizována dominancí estrogenů a luteální periodu, zahrnující metestrus a diestrus, která je charakterizována dominancí progesteronu (Saltzman et al., 2011).

U primátů není regrese žlutého tělíska během konce luteální fáze ovlivněna cyklem dělohy, ale předpokládá se vliv lokálního luteolytického faktoru, např. estronu, který je produkován přímo žlutým tělískem (Norris, 2007).

V případě oplodnění a nidace vajíčka, začíná být během 5 – 6 týdnů březosti produkován progesteron žlutým tělískem, ale v následujících týdnech březosti je hlavním zdrojem tohoto hormonu placenta. Hladiny estrogenů (a jejich metabolitu estriolu) významně rostou během prvních týdnů březosti (Heistermann et al., 1996).

Hormonální řízení estrálního cyklu se odehrává na třech úrovních, společně označovaných jako reprodukční osa. Orgány reprodukční osy jsou hypotalamus, hypofýza a vaječníky. Pro správný průběh estrálního cyklu je nutná funkčnost a souhra všech tří úrovní (Saltzman et al., 2011).

Před nástupem pohlavní dospělosti, která je charakterizována zvýšením hladiny gonadotropních hormonů, vaječníky obsahují primordiální folikuly skládající se z primárních oocytů. U většiny savců se předpokládá, že ve vaječnicích nejsou žádné oogonie, protože všechny podstupují meiózu a přeměňují se v primární oocyty před nebo krátce po porodu. S nástupem pohlavní dospělosti dokončí jeden primární oocyt meiozu a vytvoří vajíčko během každého ovariálního cyklu. Kvůli absenci regenerujících pohlavních buněk a oogonií klesá počet primárních oocytů po každém ovariálním cyklu.

Nedávné výzkumy objevily, že obnovy schopná oogonia se mohou nacházet ve výstelce samičích vaječníků primátů, myši i člověka a tyto pohlavní buňky mohou být důležité pro udržování reprodukčních folikulů a vývoj oocytů až do dospělosti (Norris, 2007). U většiny primátů je růst folikulů, ovulace a tvorba žlutého tělíska (*corpus luteum*) spontánní, nezávislý na stimulech páření, hovoříme o spontánní ovulaci (Einspanier et Gore, 2005; Martin, 2007). U většiny primátů během ovariálního cyklu ovuluje jen jeden folikul, neboť většina primátů rodí jen jedno mládě, což je spojené s vysoce rozvinutým sociálním systémem. Jedinými primáty s vícečetnou ovulací jsou kosmanovití, čeleď *Callitrichidae* Gray 1821, kde se běžně rodí dvojčata (Einspanier et Gore, 2005).

1.5.2 Délka ovariálního cyklu u gibbonů *Nomascus*

U většiny starosvětských primátů a „velkých opic“, kam patří giboni a lidoopi včetně člověka, můžeme mluvit v souvislosti s ovariálním cyklem o menstruaci, kdy je možné u samic zaznamenat výtok děložní krve (Norris, 2007; Saltzman et al., 2011). Naopak u poloopic hovoříme jen o estrálním cyklu, kdy je možné zaznamenat pouze určité změny na vnějších pohlavních orgánech a v chování zvířete. Novosvětští primáti jsou specifictí druhově, kdy není zcela jednoznačné, zda je možné hovořit o menstruaci nebo jen estrálním cyklu. Vhodnějším termín pro popis je tedy „ovariální“ cyklus než estrální cyklus (Saltzman et al., 2011).

Délka ovariálního cyklu a doba trvání folikulární a luteální fáze se značně liší mezi jednotlivými druhy primátů. U poloopic, podřád *Strepsirrhini* É. Geoffroy 1812, je délka ovariálního cyklu v průměru 30 – 50 dní, u novosvětských primátů, oddělení *Platyrrhini* É. Geoffroy 1812, je délka ovariálního cyklu od 16 do 30 dní, u starosvětských primátů, oddělení *Catarrhini* É. Geoffroy 1812, je délka ovariálního cyklu od 24 do 35 dní, u gibbonů (čeleď

Hylobatidae) je uváděna délka ovariálního cyklu 20 až 30 dní a u lidoopů včetně člověka je délka ovariálního cyklu uváděna od 25 do 50 dní (Van Hor et Eaton, 1979; Dixson, 2012; Martin, 2007; Thompson, 2009; Ziegler et al., 2009). Maheshwari et al. (2012) studovali 4 samice gibbonů stříbrných (*Hylobates moloch*) v zoologických zahradách Indonésie, kdy odebírali výkaly pro stanovení hladiny metabolitu glukokortikoidu pregnandiolu a vzorky krve pro stanovení progesteronu ze séra. Metabolity z výkalů plně korelovaly s hladinami hormonů ze séra a délka ovariálního cyklu byla stanovena na 25 – 29 dní, z čehož folikulární fáze trvala 14 – 15 dní a luteální fáze trvala 10 – 14 dní. Tyto hodnoty se shodují i s výsledky pozorování Hodgkiss et al. (2010), kdy k určení délky cyklu využívali u samic záznamů o menstruačním krvácení, délka cyklu činila v průměru 25,6 dní a dle otoku genitálií, kdy nejvyšší otok byl brán za dobu ovulace, a délka cyklu činila 27,3 dní. Naproti tomu u *Hylobates pileatus* byla na základě rozboru estrogenů a progesteronů z moči stanovena délka ovariálního cyklu u samic na $22,4 \pm 0,24$ dní (Aramaki et al., 2010).

Většina dřívějších studií zabývajících se stanovením délky ovariálního cyklu gibbonů *Nomascus*, využívala k determinaci také záznamy intervalů mezi menstruačním krvácením (Pocock, 1905; Fisher, 1980; Zhen, 1989), kdy je délka cyklu uváděna v průměru okolo 25,6 – 30 dní (Pocock, 1905; Zhen, 1989), nebo i 41 – 49 dní (Fisher, 1980).

Bachmann et Sodano (2001) stanovili délku ovariálního cyklu u gibbonů bělolících (*N. leucogenys*) v délce 23,8 dní na základě pozorování otoků vnějších genitálií samic a záznamů ošetřovatelů o menstruaci samic. Otoky vnějších genitálií samic jsou u těchto gibbonů značně individuální záležitostí, jak vyplývá z osobních zkušeností mnoha chovatelů v zoologických zahradách, a nelze je brát za hlavní ukazatel doby říje (Bolechová - nepublikováno), podobné výsledky uvádí i Geissmann et Anzenberger (2009), kteří porovnávali několik metod stanovení ovariálního cyklu u gibbonovitých a zjistili, že používání dat o menstruaci nadhodnocovalo délku ovariálního cyklu, než např. u jiných druhů gibbonů, jako je siamang (*Symphalangus syndactylus*) nebo lar (*Hylobates lar*), kde mají samice mnohem výraznější i pravidelné změny na vnějších pohlavních orgánech (zabarvení a otok stydkých pysků), podle nichž je možné rozeznat fázi reprodukčního cyklu (Palombit, 1985).

Oproti tomu Lukas et al. (2002) stanovil pomocí RIA (Radioimmunoassay) analýz délku ovariálního cyklu u samic *N. leucogenys* na 21,9 dní, což odpovídá i výsledkům Geissmann et Anzenberger (2009), kteří popsali reprodukční cyklus gibbonů zlatolících (*N. gabriellae*). Ve své studii uvádějí u dvou těchto samic délku ovariálního cyklu $21,1 \pm 1,2$ dní, diagnostikováno

z metabolitů steroidů z moči pomocí EIA (Enzymimmunoassay) analýz. U jedné samice uvádějí pravděpodobný nástup první menstruace ještě před změnou barvy srsti z černé na béžovou. Během studie bylo samičce 7,5 let a nebyla ještě zcela přebarvena, přesto vykazovala pravidelný cyklus. U obou studií se však jednalo o malou základnu analyzovaných jedinců (1-3). Na základě stejné metodiky byly vypočítány i ovariální cykly u 4 samic *N. leucogenys* ve studii Rafacz et al. (2013), kdy průměrná délka ovariálního cyklu činila $25,0 \pm 4,7$ dny a pro 1 samici *N. gabriellae* byla stanovena průměrná délka ovariálního cyklu na $24,0 \pm 1,7$ dne.

1.5.3 Puberta – nástup pohlavní dospělosti u gibbonů *Nomascus*

Termín puberta charakterizuje fyziologický stav gonád, kdy jsou plně hormonálně a gametogeneticky funkční. Tento proces může být postupný nebo náhlý, v závislosti na druhu zvířete a může být doprovázen řadou morfologických změn (Norris, 2007).

Ve srovnání s mnoha dalšími druhy savců, mají primáti prodloužené období prepubertální i prodloužené období reprodukční zralosti, označované jako puberta. Toto období je charakterizováno morfologickými, fyziologickými a behaviorálními změnami aktivovanými činností osy hypotalamus-hypofýza-gonády (HPG) tj. *gonadarche*, a u některých druhů po ose hypotalamus – hypofýza – kůra nadledvin (HPA) tj. *adrenarche* (Saltzman et al., 2011).

V sociálním systému gibbonů, ať už monogamním nebo polygynním, odcházejí potomci v určitém věku z rodné skupiny pro zajištění si budoucího partnera a zajištění vlastní reprodukce. Doba emigrace od rodné skupiny může záviset na velikosti životního prostoru a počtu dosud se nerozmnožujících jedinců, ale agresivní rodičovské chování a počet sourozenců ve skupině může hrát také významnou roli. Všechny tyto faktory ovlivňují sociální prostředí a tím také mohou ovlivňovat dobu nástupu pohlavní dospělosti (Emlen, 1995; Milne et Judge, 2011; Ziegler et al., 1987; Zhou et al., 2008).

Brockleman et al. (1998) uvádí u gibbonů *H. lar* odchod samců z rodné skupiny ve věku až 10 let a samic okolo 8,6 let věku. V porovnání se zkušenostmi chovatelů gibbonů *Nomascus* v zoologických zahradách je 7 - 8 let věku horní hranice pro odchod mláďate ze skupiny, kdy se začíná měnit chování rodičů vůči těmto potomkům (Bolechová – nepublikováno). Burns et Dooley (2011) popisují ve své studii ze ZOO Perth agresivnější nárůst chování otce vůči synovi u gibona stříbrného (*H. moloch*) v období puberty, a u *N. leucogenys*, také ze zoo, byla popsána

zvýšená agresivita matky vůči dceři okolo 5 let jejího věku, jakožto možný způsob inhibice nástupu reprodukční aktivity u této mladé samice (Burns et Judge, 2016).

Změna v chování, jako je snížení hravého chování, změna ve vzdálenosti kontaktu s rodiči, nárůst sexuálního chování v souvislosti s věkem, to vše může naznačovat přechod z juvenilního období do období adolescence a nástupu puberty (Caine, 1986; Fagen, 1993; Hewlett et Hewlett, 2013; Pereira et Altmann, 1985).

Studie Burns et Judge (2016) u *N. leucogenys*, *H. moloch* a *S. syndactylus* v prostředí zoologických zahrad ukazuje na snížení hravého chování a zvýšení vzdálenosti kontaktu od rodičů okolo 4 – 6 let, což předpokládá mnohem větší plasticitu ve věkových kategoriích ovlivněnou složením rodiny. Studie Burns et Dooley (2011) uvádí změnu vnitřních sociálních interakcí s narozením nového potomka. Předpokládá i větší plasticitu v toleranci rodičů, kdy subadultní jedinci nemohou odejít od rodné skupiny, ale naopak se jako první zapojují do péče o narozené mládě. Vše je však ovlivněno reprodukčním statutem rodiny a individuální kompeticí dospívajícího potomka s rodičem stejného pohlaví (Burns et Dooley, 2011).

Rafacz (2010) spojuje odchod mláděte ze skupiny s dosažením pohlavní dospělosti ve věku 7 – 8 let, obdobný věk popisují i Leighton (1987) a Barlett (2007) z pozorování z volné přírody, kdy potomci opouštěli rodnou skupinu. Naproti tomu studie Zhou et al. (2008) uvádí odchod potomka od rodiny u *N. hainanus* již ve věku 5,5 let.

Geissmann (1991) předpokládá nástup pohlavní dospělosti okolo 6. až 8. roku věku, který však může být velmi variabilní. Chovatelé ze zoologických zahrad spojují pohlavní dospělost se změnou barvy srsti u samic, což odpovídá 6. až 8. roku věku. Rawson et al. (2011) ale uvádí nástup pohlavní dospělosti u gibbonů chovaných v lidské péči již v 5 letech jedince. Změna barvy srsti u mladých samic je obvykle v dosavadních studiích spojována s nástupem sexuální dospělosti (Delacour, 1951), ale jak uvádí Deppute et Leclerc-Cassan (1981), může být velmi variabilní. Burns et Judge (2016) uvádí příklad jedné subadultní samice *N. leucogenys* z chovu, která začala přebarvovat ve věku okolo 6,5 – 7 let, při odsunu z rodné skupiny, kdy byl zaznamenán i nepravidelný otok vnějších genitálií.

Dle doporučení Husbandru Guidelines pro chov gibbonů *H. moloch* Audebert 1798 a *Hylobates pileatus* Gray 1861 se spojuje doba pohlavní dospělosti i se změnou chování, kdy se dospívající jedinci začínají stranit rodné skupiny a snaží se vytvořit vlastní teritorium, a kdy je doporučeno

tyto jedince ze skupin vyjmout. Věk, kdy dochází k této změně chování, je velmi variabilní dle jedince, od 5 do 9 let stáří (Mootnick, 1996; Cocks, 2000). Pro rod *Nomascus* neexistuje doposud Husbandry guidelines, přesto tato změna chování je pozorovatelná i v těchto rodinách gibbonů, často doprovázená i zvýšenou agresí ze strany rodičů k dospívajícímu jedinci (Burns et Judge, 2016).

Důvodem rychlejšího nástupu pohlavní dospělosti u zvířat v chovech může být energeticky bohatší výživa umožňující rychlejší somatický růst a celkově rozdílná aktivita umožňující rychlejší rozvoj (Melfi et Marples, 2000). Předpokládá se i souvislost změny chování s dospíváním na hypotalamo – hypofyzární úrovni (Burns et Judge, 2016).

1.5.4 Březost u gibbonů *Nomascus*

Délka březosti u gibbonů se uvádí okolo 7 měsíců. První historické údaje cituje ve své práci Rode (2009), který odkazuje na poznámky S. R. Tickela z roku 1864 o *Hylobates lar*, který popisuje délku březosti u těchto gibbonů, pozorovaných ve volné přírodě, okolo 7 měsíců, taktéž odkazuje na pozdější pozorování S. H. Robinsona z roku 1923, kdy se jedná opět o gibony *H. lar*, ale chované v zoologické zahradě – délka březosti je opět udávána 7 měsíců. Geismann (1991) uvádí ve své studii délku březosti u gibbonů rodu *Nomascus* 200 – 212 dní.

Informace o délce březosti u gibbonovitých (*Hylobatidae*) jsou minimální. Petersen et al. (2010) uvádí březost u gibona bělolícího (*N. leucogenys*) mezi 210 – 211 dny. Rafacz (2010) za pomoci EIA analýz uvádí délku březosti okolo 184 ± 14 dní pro *N. leucogenys* i *N. gabriellae*. Obě studie vycházejí z údajů o zvířatech chovaných v lidské péči. Studie Zhou et al. (2008) z volné přírody, uvádí délku březosti u *N. hainanus* v průměrné délce 240 dní s fenologickou synchronizací porodů do období hojnosti potravy v deštných lesích.

Barelli et al. (2007) ve své studii z volné přírody, popisuje samice gibbonů bělolících (*N. leucogenys*), které se pářily během plodných i neplodných dnů, tj. během folikulární a luteální fáze. Podobné zkušenosti mají i chovatelé ze zoologických zahrad, kdy je zaznamenáváno páření i v těsné době před porodem. Zvýšení ochoty samice k páření a tím předpokládané doby říje je možné vysledovat z různých změn chování samice, což je ovšem velmi individuální záležitostí jedinců (Bolechová – nepublikováno).

Cheyne and Chivers (2006) uvádí ve své studii ze záchrané stanice Kalaweit (Borneo) změnu chování samice u druhu *Hylobates agilis* a *Hylobates muelleri*, kdy samice vyzývaly samce

k páření nastavováním se a strkáním. Toto chování bylo častější při zvýšení zarůžování a zduření (tumescence = zduření, naběhnutí naplněním krví či jinou tekutinou v tkáni) vnějších genitálií. Barelli et al. (2007, 2008) uvádí ve studii z volné přírody u *H. lar*, že samice vykazovaly různovější vnější genitálie během folikulární fáze ovariálního cyklu a páření probíhalo během celého cyklu. V případě nejvyšší tumescence byla zaznamenána ovulace v 80% případů, avšak páření probíhalo i během ztráty zduření vnějších genitálií.

Vzhledem k tomu, že tumescence se běžně vyskytuje především u samic ve více skupinovém sociálním systému, může být důvodem tohoto projevu u samic gibbonů jejich snaha o zvýšení atraktivnosti a tak možnosti páření mimo vytvořený pár (Thompson, 2009), jak naznačují i poznatky uvedené v kapitole 1.4 o Sociálním systému gibbonů, kde ne vždy se musí jednat o striktní monogamii.

Rafacz (2010) prováděla studie na gibonech chovaných v zoologických zahradách a uvádí, že progesteronové metabolity byly u samic v době březosti 7x vyšší (2334, 4 ± 60,3 ng/g výkalů) než během estrálního cyklu (309, 1 ± 9,2ng/g výkalů). Poukazuje i na zvýšení estrogenů u samic v souvislosti s březostí, ale také uvádí u samců – otců zvýšení hladin estrogenu před porodem a po narození potomka, bohužel bez konkrétních hodnot v obou případech.

Geissmann (1991) uvádí reprodukční rychlost u páru gibbonů z volné přírody okolo 1 – 2 roků, většinou však 2 – 3 roky, jak vyplývá i z pozorování od ostatních gibbonovitých (*Hylobatidae*) (Traeholt et al., 2005). Rafacz (2010) uvádí průměrný interval porodů za 2 – 4 roky. Zhou et al. (2008) popisují u *N. hainanus* délku mezibřezosti v průměrném intervalu 24 měsíců.

1.6 Metabolismus steroidních hormonů

1.6.1 Syntéza steroidních hormonů

Základním materiálem pro biosyntézu steroidních hormonů je cholesterol (Payne and Halls, 2004 cited by Hu et al., 2010; Miller, 2008 cited by Hu et al., 2010). K syntéze dochází v steroidogenních žlázových buňkách. Potřebný cholesterol pochází z různých zdrojů. Buď je do žlázových buněk přijat společně s lipoproteiny, nebo je jimi syntetizován z acetyl-CoA (Noriss, 2007).

Steroidní hormony můžeme rozdělit do 6 tříd: testosteron (androgen), estradiol (estrogen), progesteron (gestagen), kortizol/kortikosteron (glukokortikoidy), aldosteron

(mineralokortikoidy) a kalcitrol (D - hormony) (Payne et Halls, 2004 cited by Hu et al., 2010; Miller, 2008 cited by Hu et al., 2010).

Testosteron, progesteron a estradiol jsou klasifikovány jako pohlavní steroidy. Prvním důležitým meziproduktem biosyntézy většiny steroidních hormonů je pregnenolon, který se tvoří z cholesterolu dvěma hydroxylacemi a oxidativním štěpením postranního řetězce při reakci katalyzované cytochromem P450 (Lambell, 1986 cited by Hu et al., 2010; Hall, 1987; Norris, 2007).

Následující dehydrací hydroxylové skupiny přemístěním dvojně vazby se vytvoří progesteron. S výjimkou kalcitriolu jsou všechny steroidní hormony odvozeny od pregnolonu nebo progesteronu. Při syntéze testosteronu z progesteronu dochází k úplnému oxidačnímu odstranění postranního řetězce, jehož výsledkem je přeměna na estradiol (Lambell, 1986 cited by Hu et al., 2010; Hall, 1987; Norris, 2007).

Granulóza buněk ovariálních folikulů sekretuje především progesteron a jeho metabolit 20a-hydroxyprogesteron a estradiol; thékální buňky syntetizují především androgeny a luteální buňky vaječnicků sekretují progesteron a jeho metabolit 20a-hydroxyprogesteron. Progesteron je také syntetizován žlutým tělískem během 6 – 8 týdne březosti, ale během následující březosti je hlavním zdrojem progesteronu placenta (Miller, 1988 cited by Hu et al., 2010; Stocco et Clark, 1996 cited by Hu et al., 2010).

Celková rychlost produkce steroidních hormonů je kontrolována peptidickými hormony. FSH (folikulo-stimulační hormon) kontroluje syntézu progesteronu a estrogenu v granulózních buňkách folikulů, zatímco LH (luteinizační hormon) reguluje syntézu progesteronu v luteálních buňkách folikulů (Sanorn et al, 1980 cited by Hu et al., 2010; Waterman et Keeneg, 1996 cited by Hu et al., 2010).

Transport steroidních hormonů v krvi zajišťují tzv. transportní proteiny. Všechny se mohou relativně nespecificky vázat na albumin. Specifická je však vazba testosteronu a estradiolu na SHBG (sex hormone binding globulin) a progesteronu a kortizolu na transkortin (Sanorn et al., 1980 cited by Hu et al., 2010).

1.6.2 Degradace steroidních hormonů

K inaktivaci steroidních hormonů dochází nejčastěji v játrech. Mezi nejčastější reakce patří hydroxylace, oxidace a redukce oxoskupin. V závěru jsou steroidní metabolity konjugovány s kyselinou glukuronovou nebo sulfátem.

Kombinací více inaktivačních reakcí vzniká řada steroidních metabolitů např. progesteronu (pregnandiol, hydroxylovaný pregnan), estrogeneru (estradiol, estron) a androgenů (5 α -androstan-3 α -ol), které jsou částečně vyloučeny v exkrementech (moči, výkaly) (Norris, 2007; Heistermann, 2010; Hodges et Heistermann, 2011).

Metabolity steroidů vyloučené močí, jsou v konjugované formě, oproti metabolitům ve výkalech, které mají nekonjugovanou formu (Heistermann, 2010).

1.6.3 Fytoestrogeny a jejich vliv na reprodukci

Rozeznáváme 4 skupiny fytoestrogenů: isoflavonoidy (genistein, dadzein, equol), kumestany (kumestol), lignanany (enterolakton), stilbeny (stilben, resveratrol). Největší zastoupení isoflavonoidů najdeme především v luštěninách. Fytoestrogeny podléhají metabolické přeměně v trávicím traktu a jejich metabolity lze nalézt jak v plazmě, tak v moči a výkalech (Cornwell et al., 2004, D'Alessandro et al., 2005).

Fytoestrogeny mají podobné účinky jako estrogény. Estrogény obsahují fenolový hydroxyl, nejvýznamnější je 17 β estradiol, tzv. fenol, který se v těle váže na estrogení receptory.

Je známo, že estrogény z prostředí, přijaté např. potravou mohou následně ovlivnit vývoj plodu a mají vliv na endogenní hormony (Monfort et al., 1984). Důležitým poznatkem je také vliv estrogenů během perinatálního života na modulaci replikaci genů (Kaludjerovic et Ward, 2012).

Schopnost produkovat metabolity fytoestrogenů závisí na rozdílnosti metabolismu ve střevech a kolonizaci střeva určitými bakteriálními kmeny dle druhu (Hutchins et al., 1995, Kelly et al., 1995, Lundh, 1995; Arai et al., 2000; Ueno et al., 2002; Patissaunt et al., 2009) včetně pohlaví jedince (Cassidy et al., 2006).

U makaků rhesus (*Macaca mullata* Zimmermann 1780) byl popsán vliv diety založené na zvýšeném obsahu sóji, která obsahuje isoflavonoidy genistein a daidzein, v podobě vyšší hladiny estrogenů v plazmě, než u samic krmených stejnou dietou (Stroud et al., 2006).

Příjem fytoestrogenních látek v potravě a jejich případný vliv na reprodukci, především délku ovariálního cyklu a receptivitu samic v době reprodukce byl popsán i u hulmana indočínského (*Trachypithecus phayrei* Blyth 1847) z volné přírody v Thajsku (Lu et al., 2010), u šimpanzů východních (*Pan troglodytes schweinfurthii* Giglioli 1872) v Tanzánii (Thompson et al., 2008) a u paviánů anubi (*Papio anubi* Lesson 1827) v Namibii (Higham et al., 2007).

Známa je i sezónní konzumace estrogenních rostlin u guerézy červenohlavé (*Procolobus rufomitrates* Peters 1879) a gorily východní (*Gorilla beringei* Matschie 1903) (Wasserman et al., 2012; Wasserman et al., 2013).

1.7 Metody používané ke stanovení pohlavních hormonů

Primáti byli po mnoha let chováni v laboratořích a využíváni pro biomedicínský výzkum, kdy bylo možné provádět různá fyziologická měření, zvláště hormonální (endokrinní) monitoring (Ramaswami, 1986; Petrusz et Bullock, 2005).

Endokrinologie je důležitá pro pochopení reprodukční biologie primátů a samozřejmě pomohla zlepšit chovatelská zařízení a management včetně welfare (Lasley et Savage, 2007).

Stanovení hormonů v krvi (tradiční médium) je i v současnosti nejvíce vypovídajícím údajem v endokrinologii a to nejenom u laboratorních zvířat (Lasley et Savage, 2007).

Ovšem ve většině případů, kdy nejsou zvířata na odběr krve trénována, se jedná o invazivní metodu, narušující chování zvířat, zvyšující stres, především při samotném odchytu (Reeder et Kramer, 2005).

1.7.1 Neinvazivní metody používané ke stanovení pohlavních hormonů

Mezi neinvazivní metody patří takové, při kterých nedochází k fyzickému zásahu do těla zvířete. U těchto metod se hladiny hormonů neměří z krevní plazmy, ale používají se alternativní média, jako jsou sliny, moč, trus/výkaly (Heistermann, 2010). V případě zvířat v zoologických zahradách, kdy je každé odchytávání či anestezie zvířat rizikovou záležitostí pro daného odebíraného jedince, jsou neinvazivní metody maximálně efektivním řešením

(Bolechová – nepublikováno). Jakékoliv stresové podmínky také navíc ovlivňují reprodukci a průběh ovariálního cyklu: suprese cirkulujících gonadotropinů a gonádních steroidních hormonů vede k narušení normálního menstruačního cyklu (Cameron, 1997).

Pro zoologické zahrady je sledování reprodukčního cyklu důležitým krokem zejména pro zlepšení efektivity managementu chovu. Nejen z pohledu welfare, ale také z pohledu nákladnosti a dostupnosti, je využití neinvazivních metod při sledování reprodukčního cyklu v posledních letech upřednostňováno. V podmínkách zoologických zahrad je nejsnadnějším řešením analýza z exkrementů, kterou je možné stanovit skoro všechny metabolity steroidních hormonů, které regulují reprodukční cyklus samců a samic (Schwanzenberger, 2007).

Rozbory moči jsou efektivní pro možnost zachycení většiny metabolitů různých hormonů, ale moč se obtížně sbírá, především u skupinově chovaných zvířat. Také obsah metabolitů steroidů se různí během dne, tzv. cirkadiánní rytmus (ranní moč je koncentrovanější), a reprezentuje tak kratší obrazec (cca 6hod) než exkrementy (výkaly) (cca 24hod) (Brown, 2006; Monfort, 2003; Heistermann, 2010). Rozbory výkalů jsou výhodou – snadnější sběr s minimálním rušením zvířat a mohou být odebírány dlouhodobě (Brown, 2006).

V posledních letech došlo k velkému pokroku ve výzkumu neinvazivních metod pro monitorování ovariálních funkcí u mnoha primátů, a to sledováním metabolitů z moči a výkalů pomocí enzymových imunologických testů (EIA neboli ELISA) a radio-imunologických testů (RIA) z metabolitů moči a výkalů. Přednosti těchto metod spočívají v jednoduchém postupu práce a rychlé analýze měřených látek. Podstatou těchto imunochemických metod je kompetice měřeného hormonu se značeným hormonem o vazebné místo na polyklonální protilátce (Muir et al., 2001; Palme, 2005).

EIA metoda je v poslední době ve výzkumu nejen v zoologických zahradách upřednostňována před RIA metodou, neboť nevyžaduje manipulaci s radioaktivním materiálem (Graham, 2001).

Při neinvazivních analýzách ovšem neměříme okamžité hladiny hormonů, jak je zmíněno výše, ale hladin jejich metabolitů, protože hormony jsou během exkrece metabolizovány. Může tedy docházet ke změnám v koncentracích mezi uvolněním látek do krve a měřením jejich hladin např. ve výkalech. Proto je nutná analytická nebo popř. biologická validace enzymové imunoanalýzy (Palme, 2005).

Analytická validace slouží k ověření toho, zda je cílový metabolit hormonu změřitelný pomocí EIA analýzy s co největší přesností. Ke stanovení této validace slouží kritéria jako je přesnost, specifita („cross-reaction“), citlivost, preciznost (koeficient variability) analýzy a výběr vhodné analýzy (Möstl et al., 2005).

Biologická validace slouží k otestování dat, zda jsou biologicky smysluplné. Lze použít invazivní cestu, tj. např. podání injekčně radioaktivního hormonu a následné změření metabolitů ve výkalech pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie a zjištění, zda vykázaný radioaktivní pík vykazuje imunoreakci s použitou protilátkou (Möhle et al., 2002; Palme et al., 2005). Další metodou je stimulace nebo suprese hormonů farmakologicky, tj. invazivně (např. ACTH, GnRH) a porovnání, zda metabolity nalezené ve výkalech reflektují stimulaci nebo supresi (Möhle et al., 2005; Touma et al., 2005; Wasser et al., 2000) anebo porovnání referenčních hodnot krve s vyloučenými hladinami hormonů (Goymann, 2005). V případě imunotestů však protilátky rozeznají jen některé metabolity a tak může dojít k rozdílu ve výsledcích v porovnání s hormony z krevního séra (Goymann, 2012).

Další možností je test předpokládaných odchylek a rozdílů (např. hladin hormonů v různých reprodukčních stádiích a pohlaví a vyhodnocení vzájemných vztahů příčina – účinek (např. vliv transportu, odchyty, úhyn mláďete), neboť hladiny metabolitů hormonů odrážejí momentální biologický stav zvířete (Heistermann, 2011).

1.7.2. Rychlost vylučování metabolitů hormonů

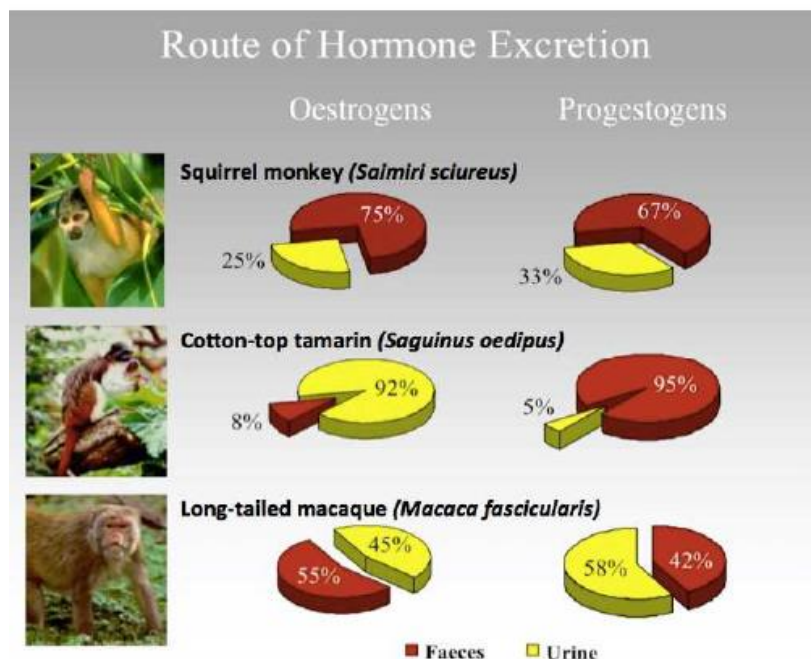
Možnost intenzity odběru vzorků výkalů je variabilní mezidruhově, podle rychlosti pasáže střevy a druhem krmiva. U velkých primátů (lidoopi, starosvětští primáti) jsou hormony vylučovány během 24 – 48 hod. intervalu po začátku cirkulace v krvi (Bahr et al., 2000; Heistermann et al., 1993), zatímco u malých primátů (*Callithrichidae*) je pasáž rychlejší (od 4 do 16 hod) (Bahr et al., 2000).

Rozdíly v metabolismu steroidů byly také zaznamenány mezi jednotlivým pohlavím u paviánů babuinů (*Papio cynocephalus* Linnaeus 1766), tzn., že existuje nejen behaviorální, ale i fyziologický rozdíl mezi samci a samicemi (Lynch et al., 2003; Gesquiere et al., 2005, 2007).

Charakteristika časového zpoždění (time lag) je důležitá pro správnou interpretaci výsledků, např. pro determinaci fyziologické události jako je např. ovulace. Tato informace je také

podstatná pro stanovení frekvence odběrů s ohledem na sledované hodnoty, Obr. č. 5 (Heistermann, 2010; Hodges et Heistermann, 2011).

Obr. č. 5 Exkrece hormonů



Způsob vylučování steroidních metabolitů u vybraných primátů dle Heistermanna (2010).

1.7.3 Využití neinvazivních metod v praxi

Oblast aplikace neinvazivních metod je velice široká. Používají se nejen u domácích zvířat (Rabiee et al., 2002, Denhard et al., 2003), tak u zvířat chovaných v zoologických zahradách nebo ve volné přírodě (Schwarzenberger, 2007).

Campbell et al. (2001) využili metody EIA ve své studii reprodukčního cyklu chápánů středoamerických (*Ateles geoffroyi* Kuhl 1820), kdy ze vzorků výkalů i moči diagnostikoval metabolity progesteronu i estrogeneru, podobně jako Moorman et al. (2002) ve své studii o kotulech veverovitých (*Saimiri sciureus* Carl Linné 1758).

Ze studií věnovaných reprodukčnímu cyklu starosvětských primátů, kdy bylo využito obdobných vzorků i metody, jako u výše zmíněných novosvětských primátů, můžeme uvést například studii Lynch et al. (2003) zabývající se ovariálním cyklem více druhů paviánů ve

volné přírodě a další studie prováděné v umělých chovech zvířat (zoologické zahrady nebo záchranné stanice) a to studie Heistermann et al. (2001) o makacích lvích (*Macaca silenus* Linnaeus 1758), Fujita et al. (2001) o makacích červenolících (*Macaca fuscata* Blyth 1875), Fürtbauer et al. (2010) o makacích asámských (*Macaca assamensis* McClelland 1840), Engelhardt et al. (2005) o makacích jávských (*Macaca fascicularis* Raffles 1821) anebo studie Phillips et Wheaton (2008) věnovaná mandrilům rýholícím (*Mandrillus sphinx* Linné 1758). Ve všech těchto studiích byly diagnostikovány hladiny metabolitů hormonů estrogeneru a progesteronu.

Ke studiím nejbližších příbuzných gibbonů využívající EIA analýz k diagnostice reprodukčního cyklu patří například studie Miyamota et al. (2001) o gorilách nížinných (*Gorilla gorilla gorilla* Savage 1847), kde byly využity vzorky výkalů, obdobně jako ve studii stejného druhu primáta od Atsalise et al. (2004). Ovariálnímu cyklu šimpanzů (*Pan troglodytes* Blumenbach 1776) se věnuje ve své studii Thompson (2005), který diagnostikoval hladiny metabolitů progesteronu a estrogeneru ze vzorků výkalů i moči, podobně jako Jurke et al. (2000) u šimpanzů bonobo (*Pan paniscus* Schwarz 1929).

1.7.4 Neinvazivní metody u čeledi *Hylobatidae*

Do studií věnovaných čeledi *Hylobatidae* – gibbonovití využívající EIA metody k diagnostice reprodukčního cyklu patří studie o gibonech *H. pileatus* (6 samic, 119 vzorků) od Aramakiho et al. (2010), kdy byly použity vzorky moče ke stanovení hladin metabolitu estrogeneru a progesteronu a studie Barelli et Heistermann (2009) o ovariálním cyklu *H. lar* (9 samic, vzorky z 15ti ovariálních cyklů), kdy byly využity vzorky výkalů. Studie Maheshari et al. (2012) na 4 samicích gibbonů stříbrných (*H. moloch*) využívá jak vzorků výkalů, tak vzorků krve, ke stanovení ovariálního cyklu (5 – 7 vzorků/cyklus po dobu 3 měsíců). V předchozí studii Maheshari et al. (2010) u 3 těchto samic gibbonů byl stanoven také konjugát estronu a pregnandiolu z výkalů pro zjištění případné korelace s otokem vnějších genitálií samic.

Metoda EIA využitá pro diagnostiku ovariálního cyklu u gibbonů rodu *Nomascus* je popsána pouze ve dvou studiích: Geissmann et Anzenberger (2009), kteří stanovovali délku ovariálního cyklu u 3 samic; a Rafacz (2010), která prováděla měření hladiny steroidních hormonů u 5 samic a 4 samečů. Geissmann et Anzenberger (2009) využívaly jak vzorků moči, tak i výkalů, Rafacz (2010) a Rafacz et al. (2012, 2013) pouze vzorky výkalů. Neinvazivní metody pro

analýzu ovariálního cyklu u páru gibbonů *N. leucogenys* využili ve své studii i Lukas et al. (2002), jak je uvedeno v kapitole o délce ovariálního cyklu, jednalo se však o metodu RIA.

Na základě zkušeností z předchozích studií potvrzujících validitu neinvazivních metod pro stanovení hladin hormonů a snahu zachování maximálního welfare v chovu zvířat, byla pro tuto studii vybrána následující EIA metoda.

1.8 Vybraná neinvazivní metoda pro stanovení pohlavních hormonů

1.8.1 ELISA = EIA metoda – kompetitivní typ

ELISA (enzymově značen imunotest s využitím pevné fáze) používá ke značkování komplexu antigen-protilátka enzymy (Crowther, 2009). Většina ELISA metod jsou stanovení na pevné fázi, kde buď antigen, nebo protilátka jsou adsorbovány na povrch pevného nosiče. Některé pracovní protokoly ELISA jsou založeny na kompetitivním charakteru vazebné reakce ligand-protilátka, jiné naopak vycházejí z nekompetitivního charakteru vazebné reakce. Ve všech postupech je zařazen krok separace vázaného enzymového konjugátu od volného enzymového konjugátu. Množství vázaného enzymového konjugátu stanovíme po přidání substrátu měřením katalytické reakce enzym-substrát. Jedna molekula enzymu může během několika minut přeměnit velké množství molekul substrátu na stejné množství molekul produktu, poskytující zesílenou a snadno detekovatelnou změnu v zabarvení (Möstl et al., 2005).

Protilátky používané při ELISA metodách mohou být monoklonální i polyklonální. Při technikách ELISA mohou protilátky vystupovat v neznačené podobě nebo ve formě konjugátů. Antigeny jsou získávány purifikací z přírodního materiálu nebo rekombinační technologií. Jsou používány jako enzymové konjugáty buď v rozpustné, nebo imobilizované formě. Standardy a kontrolní séra jsou dodávány jako lyofilizovaná séra s azidem sodným a s deklarovanou koncentrací antigenu.

Enzymové konjugáty jsou buď antigeny, nebo protilátky kovalentně navázané na vybraný enzym. Při přípravě konjugátu lze postupovat tak, že protilátky a enzymy jsou nekovalentně značkovány biotinem a pak se využívá jeho silné vazebné afinity k avidinu.

Pufry, které se při ELISA metodách používají, slouží k ředění vzorků a činidel v soupravě a k jejich rekonstituci z lyofilizované formy. Reakce ELISA probíhají v prostředí pufrů, které zajišťují určité pH a koncentraci iontů.

Při ELISA metodách se používá ke značení enzym peroxidáza a její substrát peroxid vodíku, který v přítomnosti chromogenu 1,2- diaminobenzenu dává měřitelný žlutooranžový produkt. Dalším enzymem, který se využívá ke značení imunokomplexů, je b-D-galaktosidasa a její substrát *o*-nitrofenyl-b-D-galaktopyranosid, který je přeměňován na měřitelný žlutý nitrofenolový produkt. Ke značení se také často používá alkalická fosfatáza a její substrát *p*-nitrofenylfosfát, který je přeměňován na nitrofenolát.

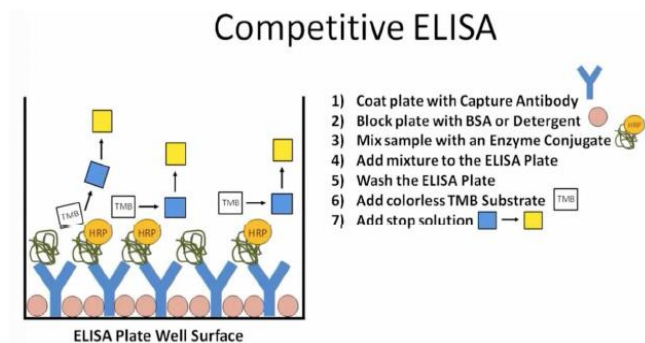
Zastavujícím činidlem peroxidázové reakce je 1M kyselina sírová, která zároveň stabilizuje konečný barevný produkt enzymové reakce.

K detekci antigenu se často používá technika ELISA využívající kompetitivní vazebnou reakci na pevné fázi. U tohoto typu stanovení soutěží o vazbu na omezený počet vazebných míst na pevném povrchu imobilizovaných protilátek neznačený ligand s ligandem značeným enzymem. Po krátké inkubaci je separován volný komplex od komplexu vázaného. Po promytí je přidán substrát a enzym přítomný ve vázané frakci jej přemění na barevný produkt. Množství vzniklého produktu je nepřímo úměrné koncentraci neznačeného ligandu v testovaném vzorku (Obr. č. 6). Absorbance standardů, kontrolních a testovacích vzorků je měřena na ELISA readru při příslušné vlnové délce. Referenční jamky, které obsahují jen konjugát ligandu s enzymem, vykazují nejintenzivnější zbarvení. Úbytky zbarvení v jamkách jsou úměrné množství nekonjugovaného antigenu (Heistermann, 2011).

Standardní křivky dostaneme lineárním vynesemím průměrných hodnot absorbancí dvojic standardů na osu *y* proti příslušné koncentraci antigenu na ose *x*. Koncentrace antigenu v kontrolních a testovaných vzorcích, stanovovaných současně se standardy, mohou být stanoveny odečtením průměrných absorbancí vzorků ze standardní křivky. Tuto závislost běžně zpracovává počítač zabudovaný v ELISA readru (Crowther, 2009).

Pomocí EIA – enzymového imunitestů je možné sledovat steroidní metabolity estrogenu (konjugovaný estron) a progesteronu (pregnenediol-3-glucuronid). Tyto metabolity představují nejčastěji detekované metabolity steroidních látek u většiny primátů (Heistermann, 2010).

Obr. č. 6



Princip kompetitivní ELISY dle Denharda (2011).

1.8.2 Validace metody pro detekci hormonů z výkalů

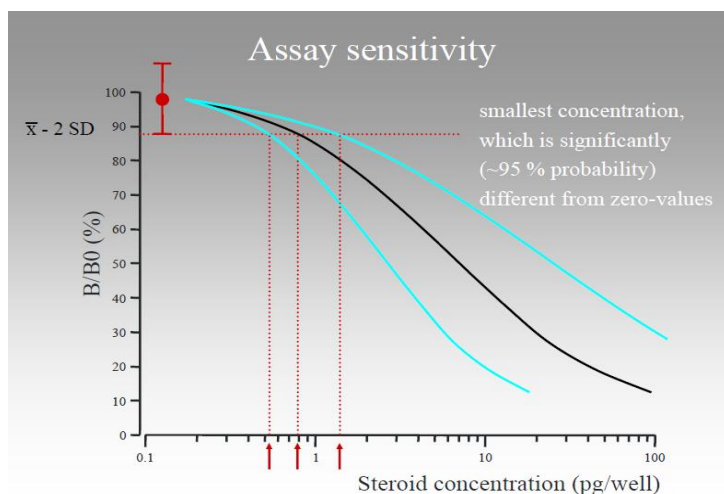
Validace naměřených hormonů má formu jednak analytickou, která potvrzuje přesnost měření, a jednak biologickou, která potvrzuje, že naměřené hodnoty hormonů reflektují fyziologické výsledky.

1.8.2.1 Analytická validace

Laboratorní neboli analytická validace prokazuje, že sledované hormony jsou změřeny přesně. Tato validace je založena na několika kritériích:

- senzitivita: nejnižší možná naměřená koncentrace steroidu, Obr. č. 7:

Obr. č. 7 Senzitivita analýzy



Palme (2009) upravený dle Heistermann (2011).

- přesnost ve stanovení (intra assay) a přesnost v čase (inter-assay), které sumárně charakterizují vlastní přesnost analytické metody (analytický rozptyl). Principem je porovnání několikrát za sebou koncentrace specifického vzorku na stejné mikrotitrační destičce a porovnání koncentrace několika rozdílných vzorků jejich analýzou např. 3x na různých mikrotitračních destičkách stejné vzorky.

Kontrola kvality – tzv. standardy, jsou používány ke kontrole přesnosti analýzy. Jedná se o homogenní vzorky, které jsou analyzovány při každém rozboru k vyhodnocení odchylky analýzy.

- přesnost: stupeň, při kterých jsou naměřeny skutečné hodnoty. Jedná se o test, zda naměřená hodnota je přesná. K tomuto účelu se využívá standardní křivky a měřených vzorků rozložených v její rovině.
- souběžnost/paralelismus: mezi postupně nařazenými vzorky a standardní křivkou se stanovuje testem shody dvou sloupců.
- specifčnost (zkřížená reakce): analýza je specifická, pokud protilátka reaguje jen se specifickým steroidním hormonem, který analyzujeme. Ve skutečnosti téměř všechny protilátky mohou reagovat i s jinými substancemi, protože obvykle se spojují jen s částí molekuly, takže analýzy jsou skupinově specifické. Tento fenomén se nazývá zkřížená reakce (cross-reactivity). Zkřížená reakce protilátek může přinést problém díky společnému naměření nebo zkřížené reakci metabolitů s rozdílným původem. Ale na základě výzkumu Coralie Munro (University of California, Davis), je zkřížená reakce u protilátek pro progesteron a estrogen méně jak 0,1% s ostatními podobnými metabolity steroidů (Munro et al., 1984; Munro et al., 1991).

1.8.2.2 Biologická validace

Biologická validace je nezbytná pro zajištění, že neinvazivní měření hormonů poskytuje biologicky smysluplná data hledaných endokrinních výsledků.

Porovnání koncentrace cirkulujícího a vyloučeného progesteronu v moči a výkalech v analýzách prováděných Heistermann et al. (1993) vykazovaly podobné hodnoty: zvýšená hladina v krevních vzorcích paralelně korespondovala se zvýšením hladin ve vzorcích moči a výkalech.

Fyziologické a biologické působení steroidních hormonů umožňuje předpokládat změny jejich hladin a možnost měření v určitém časovém období reprodukce (folikulární fáze, luteální fáze, březost, laktace), jak uvádí Barelli et al. (2007).

Rozdíly v hladinách hormonů je také možné předpokládat u různé reprodukční kondice zvířete a jeho věku (Möhle et al., 2002). Také můžeme předpokádat genderové druhově specifické rozdíly, kdy samci produkují nižší koncentraci progesteronu než samice (Rafacz, 2010).

1.9 Metody používané ke stanovení pohlaví

Jak bylo popsáno výše, vzhledem ke specifické charakteristice přebarvování těchto gibbonů a similaritě vnějších pohlavních orgánů u obojího pohlaví, je velmi nesnadné identifikovat pohlaví u juvenilních i subadultních jedinců. Jednou z metod je přímá/manuální kontrola vnějších genitálií (Deputte et Leclerc-Cassan, 1980), kdy se ovšem jedná o velmi stresující záležitost pro zvíře spojené s jeho odchytom a manipulací. Tato metoda není aplikovatelná do běžné praxe zoologických zahrad.

Další možnou metodou je vyhodnocení rozdílu močení mezi samcem a samicí. Samec močí přímým směrem ze špičky penisu a proud moči vytváří mírný oblouk, kdežto samici moč stéká přímo a koresponduje s *labia major* (velké stydké pysky) (Deputte et Leclerc-Cassan, 1980). Tato metoda však vyžaduje velmi trénované ošetřovatele a stále se nevyhneme případné chybě v diagnostice.

Pro zachování welfare a zlepšení managementu chovu tohoto rodu gibbonů je tedy preferováno využití neinvazivní metody (Lefaux, osob. sdělení).

1.9.1 Stanovení pohlavních hormonů

K vyřešení dané problematiky se nabízí stanovení steroidních hormonů, kdy můžeme předpokládat genderové rozdíly, kdy samci produkují vyšší koncentraci testosteronu než samice (Rafacz, 2010).

Ovšem vzhledem k tomu, že se jedná o diagnostiku pohlaví u nedospělých jedinců (narozených, juvenilních, subadultů), nemůžeme 100% očekávat jednoznačný výsledek, vzhledem k věku zkoumaných jedinců, kdy se nacházejí jak v období před *adrenarche*, tak

během ní, tj. před aktivní produkcí pohlavních hormonů v kůře nadledvin, v době nástupu puberty a během ní (Saltzman et. al., 2011). Dalším faktorem je i specifita diurnálního vylučování testosteronu a diagnostika androgenních metabolitů (Denhard, 2011).

1.9.2 PCR – neinvazivní metoda DNA analýza

Pro diagnostiku pohlaví zajišťující 100% identifikaci se nabízí následně metoda PCR (polymerázová řetězová reakce), jak bylo popsáno v mnoha metodikách (Bradley et al., 2001; Cadamuro et al., 2015; Di Fiore, 2015).

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je nejčastěji používanou molekulárně-biologickou amplifikační technikou v diagnostice. Cílová DNA (deoxyribonukleová kyselina) bývá často ve vzorcích v tak nízkých koncentracích, že ji není možno po izolaci přímo detekovat. Proto je nezbytné zvýšit analytickou sensitivitu její mnohonásobnou replikací (Hubert, 1998; Lodish et al., 2000).

PCR umožňuje amplifikaci DNA fragmentů až do velikosti 30000 párů bází (bp). Běžně se však používá amplifikace úseků DNA o velikosti jen 200 – 400 bp.

PCR je in vitro metoda pro enzymatickou syntézu specifických sekvencí DNA. Tyto sekvence jsou definovány tzv. primery, které se hybridizují s komplementárními úseky DNA, která má být amplifikována, pokud takovéto úseky obsahuje. Primery jsou tedy krátké jednořetězcové molekuly DNA (oligonukleotidy), jejichž sekvence je komplementární k jednomu ze dvou řetězců analyzované DNA (Hubert, 1998, Lodish et al., 2000).

Zvýšením teploty nad 90°C je dvouvláknová DNA reversibilně rozdělena na jednoduché samostatné řetězce (fáze denaturace). Po snížení teploty na cca 50°C se primery přítomné v reakčním mediu vážou na komplementární sekvence denaturované DNA dříve, než stačí DNA renaturovat (fáze přikládání – annealing). Po zvýšení teploty na cca 70°C polymeráza přítomná v reakčním mediu prodlužuje přiložené primery přidáváním nukleotidů, které jsou rovněž přítomny v nadbytku v reakčním mediu v pořadí, které je dáno pořadím komplementárních nukleotidů v denaturované DNA (fáze elongace, extenze). Nakonec je teplota zvýšena opět nad 90°C a je zahájen druhý cyklus amplifikace. Od druhého cyklu jsou vytvářeny (až na původní dva páry analyzované DNA) úseky DNA o stejné velikosti zakončené primery, které se nazývají amplicony. Amplicony mohou být detekovány nejjednodušeji po jejich elektroforetické separaci v agaróze a vizualizaci pomocí ethidium bromidu nebo nově využívaných specifických substrátů jako například SybrGreen (Roche) a podobně pod UV lampou (Hubert, 1998; Lodish et al., 2000).

Mechanismy vedoucí ke tvorbě pohlaví jsou u různých živočišných druhů různé. Savci mají odlišný pár pohlavních chromozómů, větší X a menší Y (u samců). O pohlaví rozhoduje gen *Sry* na chromosomu Y. Jeho aktivita vede k diferenciaci varlat z embryonálních gonád. Tento gen lze metodami PCR a polymorfismu délky restrikčních fragmentů stanovit z buněk. Protože gen *Sry* není na X chromozómu, je z výsledku PCR možné určit pohlaví – pokud se amplifikuje *Sry* gen, jedná se o samčí pohlaví (Fickel, 2011).

Další možnost identifikace pohlaví je využití genu pro amilogenin, který se nachází v obou sex chromozómech. Identifikaci umožňuje delece 63bp v exonu tohoto genu na Y chromozómu. Amplifikací vznikají PCR produkty o různé velikosti, které jsou velmi snadno identifikovatelné metodou elektroforézy na agarozovém gelu (Di Fiore, 2015).

Studie o determinaci pohlaví pro rod *Nomascus* existuje (Villesen et Fredsted, 2006) , ale zdrojem DNA byly vzorky krve. Z důvodu výše uvedených, týkajících se především welfare zvířat, se nabízí jako možnost rozšířit metodiku analýz z výkalů dle Di Fiore (2005) o tento rod primátů.

2. Cíle práce

2.1 Determinace pohlaví

Cílem této práce je ověření hypotézy, zda lze využít PCR metodu pro neinvazivní stanovení pohlaví u gibbonů rodu *Nomascus*.

Hypotéza bude ověřena PCR analýzou vzorků výkalů od dospělých jedinců s jasně určeným pohlavím a od mláďat v různé věkové kategorii.

2.2 Stanovení steroidních hormonů a faktorů ovlivňujících jejich cyklus

Cílem této práce je ověření následujících hypotéz:

H1: Koncentrace hormonů progesteronu a estrogeneru u samic jsou vyšší než u samců.

H2: Koncentrace hormonů progesteronu a estrogeneru se neliší mezi jednotlivými druhy gibbonů.

H3: Výše koncentrace hormonů je ovlivněná chovatelským prostředím.

H4: V posledním trimestru březosti samic se koncentrace progesteronu a estrogeneru několikanásobně zvyšují.

H5: V posledním trimestru březosti samice se zvyšuje koncentrace progesteronu a estrogeneru u samce.

H6: Koncentrace hormonů progesteronu a estrogeneru jsou vyšší ve skupině s mláďaty.

H7: S nástupem ovariačního cyklu se barva srsti u subadultních samic změní z černé na béžovou.

Hypotézy budou ověřeny sledováním výše koncentrace metabolitů steroidních hormonů a vyhodnocením biologických a chovatelských dat zvířete.

3. Materiál a metodika

3.1 Frekvence odběru vzorků a identifikace zvířete

Odběr vzorků výkalů probíhal 1x týdně do zip sáčků nebo plastových vzorkovnic za použití rukavic pro zamezení kontaminace. Vzorek o přibližné hmotnosti 1 – 2g byl řádně utěsněn a označen datem odběru včetně identifikace zvířete. Bezprostředně po odběru byl zamražen a uchován při - 20°C až do doby transportu do laboratoře.

Přehled o počtech odebíraných zvířat, době odběru vzorků vč. jejich celkového množství z dané zoo je uveden v Tabulce č. 2.

Vzhledem k tomu, že se jedná o sociální zvířata chovaná ve skupině, byla identifikace vzorku prioritou. V případě, že nebylo možné zajistit 100% odběr od daného jedince (přepuštění – separování nebo vlastní vizuální kontrola a okamžitý sběr vzorku ošetřovatelem), byla použita potravinářská krmiva do oblíbené potravy zvířete, která musela být podána individuálně danému jedinci. Kromě potravinářských barviv (Fuller et al., 2010), se v některých zoologických zahradách využilo i přirozeného „barviva“ např. mrkve, červené řepy, borůvek, atd. v konkrétní individuální krmné dávce. Vždy bylo nutné ohlídat, že obarvená potrava byla opravdu přijata sledovaným jedincem.

Frekvence odběru vzorků byla stanovena na základě předchozích zkušeností podobných výzkumů u primátů (Heistermann, 2011) a musela být také zohledněna praktická stránka odběru vzhledem k provozu a systému práce v zoologických zahradách.

Tabulka č. 2. Informace o sběru vzorků a počtu gibbonů

ZOO	Druh	Počet jedinců (samec, samice) a období sběru vzorků	Počet vzorků dle pohlaví	
			samec	samice
Asson	<i>N.leucogenys</i>	0,1 (08/2012 – 02/2013)	0	21
Bojnice	<i>N. gabriellae</i>	3,2 (01/2011 – 05/2013)	41	28
Bratislava	<i>N. gabriellae</i>	1,1 (03/2011 – 05/2012)	19	46
Eskilstuna	<i>N.leucogenys</i>	0,1 (10/2011 – 06/2012)	0	17
Hannover	<i>N.gabriellae</i>	0,1 (04/2011 – 08/2011)	0	19
Chleby	<i>N. gabriellae</i>	2,1 (03/2011 – 02/2012)	33	9
Jihlava	<i>N. gabriellae</i>	0,2 (03/2011 – 12/2013)	0	209
Liberec	<i>N. leucogenys</i>	2,2 (07/2010 – 04/2012)	38	114
Ljubjana	<i>N.gabriellae</i>	0,1 (09/2011 – 02/2012)	0	17
Lyon	<i>N.leucogenys</i>	0,1 (10/2011 – 02/2012)	0	19
Mulhouse	<i>N.siki</i>	2,2 (11/2011 – 01/2012)	11	13
Mulhouse	<i>N.leucogenys</i>	0,2 (11/2011 – 01/2012)	0	10
Mulhouse	<i>N.gabriellae</i>	2,1 (11/2011 – 01/2012)	10	11
Olomouc	<i>N. gabriellae</i>	5,2 (02/2011 – 01/2013)	131	57
Ostrava	<i>N. leucogenys</i>	2,2 (07/2011 – 04/2013)	52	24
Plzeň	<i>N.leucogenys</i>	2,0 (10/2011 – 10/2012)	142	0
Ústí nad Labem	<i>N. leucogenys</i>	1,3 (01/2011 – 06/2014)	78	375
Varšava	<i>N.gabriellae</i>	3,1 (07/2011 – 02/2012)	52	22
Celkem		25,26	607	1011

3.1.1 Informace o krmné dávce gibbonů

Pro vyhodnocení analyzovaných vzorků na obsah metabolitů estrogenů a možný vliv fytoestrogenů v potravě byly zoologické zahrady dotázány na druh a složení granulí, které mohou v koncentrované formě obsahovat případné fytoestrogenní látky. Z odpovědí vyplynulo, že ve všech zoo se nachází v požívaných granulích sója luštinatá (*Glycine max*), v menším zastoupení i vojtěška setá (*Medicago sativa*). Pouze dvě zoo nekrmí granulemi: ZOO Chleby nabízí gibbonům v krmné dávce luštěniny (čeleď *Fabaceae*) a v ZOO Hannover naklíčené obiloviny (čeleď *Poaceae*).

3.2 Metodika PCR analýzy

Pro analýzy byly použity části vzorků odebraných dle metodiky viz. 3.1. Zařazeny byly vzorky od všech sledovaných poddruhů tj. *N. leucogenys*, *N. gabriellae*, tak *N. siki*. Zvířata byla rozdělena do dvou věkových kategorií: dospělé jedince (nad 6 let) a juvenilů (od 0 do 4 roků).

Pro analýzu bylo použito celkem 16 jedinců, z nichž 6 byli dospělí jedinci s určeným pohlavím (1 samec a 1 samice byli použiti jako „pozitivní kontroly“) a od 3 juvenilů s určeným pohlavím a od 7 juvenilů s neznámým pohlavím. Celkem bylo analyzováno 22 vzorků výkalů, vzhledem k vícenásobným odběrům od 4 jedinců (Tabulka č. 3). Tyto vzorky z vícenásobného odběru stejného jedince byly použity pro verifikaci testované metody.

Ihned po odběru byly vzorky zamrazeny a uchovány při – 20 °C do doby extrakce DNA.

Pro molekulární analýzu byla DNA z výkalů extrahována pomocí QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen; Germany).

K určení pohlaví byla použita multiplex PCR se dvěma páry primerů amplifikujících fragmenty amelogenin X genu (AMEL) a k určení pohlavního chromozómu Y oblast genu *Sry*, determinující pohlaví, který byl již dříve popsán v metodice dle Di Fiore (2005).

Standartní objem každé PCR reakce byl 10 µl, což zahrnovalo 20-50 ng genomové DNA, 1 x PPP Master Mix s MgCl₂ (5mM) (Top-Bio, Česká republika), 0,4 µM od každého primeru (Generi Biotech, Česká republika) a navíc od metodiky Di Fiore (2005) bylo použito 0,1 µg/µl BSA (Sigma-Aldrich, USA).

Tepelné podmínky v cyklu byly následující: počáteční denaturace 2 minuty při 94° C, a následně 43 cyklů s denaturací při 94 °C po dobu 30 s, s fází přikládání po dobu 30 s při teplotě 56,8 °C a následně 72 °C po dobu 30 s. Finální fáze elongace trvala 5 min. při 72 °C.

Na závěr byla provedena elektroforetická separace amplifikovaných fragmentů v 3% GelRed-stained (Biotium, USA) agarózním gelu (Lonza, Switzerland).

3.3 Metodika EIA analýzy

3.3.1 Extrakce metabolitů hormonů

Pro získání metabolitů hormonů byla použita metanolová extrakční metoda spočívající v zafixování 0,5g výkalů v 4,5ml 80% metanolu. Vzorby byly následně vortexovány (10 min.) a odstředěny (30min.). Supernatant (cca 4 ml) byl zamražen až do samotné analýzy.

3.3.2 ELISA

EIA byla prováděna na ručně potahovaných mikrotitračních destičkách s rovným dnem, typ F96 MaxiSorp (Nunc, Denmark). Metodika je založená na kompetitivním typu EIA metody využívající polyklonálních látek, které se navážou k povrchu stěn mikrotitračních destiček, tzn. první protilátka zachytí steroid a označený steroidní hormon – „*label*“, (peroxidázový konjugát). Nenavázaný steroid a *label* jsou při dalším procesu vymyty. Na konci EIA testu je možné navázané enzymy generovat fotometricky, neboť bezbarvý substrát je konvertován na žlutý, v závislosti na množství navázaných enzymů. Stupeň zabarvení je inverzní ke koncentraci steroidů (Heistermann, 2011).

Pro přípravu všech roztoků a pufrů byl použit protokol deklarovaný výrobcem protilátek a konjugátů dr. Coralie Munro (Clinical Endocrinology Laboratory, University of California, Davis, USA).

3.3.2.1 Stanovení vhodné koncentrace konjugátů a protilátek

Na základě metodiky Hodges and Heistermann (2011) jsme určili vhodné ředění protilátek a konjugátů pro dosažení absorbance v kontrolních jamkách MTP mezi 0,8-1,20. Mimo to jsme museli optimalizovat koncentrace pro čtení během procesu ELISY, aby se dosáhlo potřebné úrovně senzitivity. Proto jsme vytvořili empiricky ideální koncentraci konjugátů (tracer) a protilátek specifických pro měřený steroidní hormon.

Pro zjištění vhodné koncentrace byla zachycená protilátka sériově ředěna pomocí zásobního roztoku (stock solution) napříč MTP a konjugát byl sériově nařaděn směrem od horní do spodní čísta MTP. Tento proces se nazývá “šachovnicová titrace“(checkboard titration) a umožňuje

precizně analyzovat rozdílné koncentrace všech reagentů v jednotlivé jamce pro získání nejlepší senzitivity.

Vybráno bylo ředění, které vykazovalo barevnou intenzitu okolo 1,0. Toto ředění tak zabrání, aby nebyly použity zbytečně vysoké hodnoty protilátek a konjugátů, které by snižovaly senzitivitu EIA analýzy.

Pro stanovení metabolitů progesteronu byly použity polyklonální progesteronové protilátky a progesteronové konjugáty CL 425 (Coralie Munro, University of California, Davis, USA). Pro stanovení estrogenu byly použity polyklonální estrogenové protilátky a estrogenové konjugáty R522-2 (Coralie Munro, University of California, Davis, USA).

Zkřížená reakce pro progesteronovou protilátku byla 100% s progesteronem, 55% s 5 α -Pregnan-2,20-dione, 12,5% s 5 β -Pregnan-3 β -ol-20-one, 8% s 5 β -Pregnan-3,20-dione, 2,7% s 4-Pregnen-11 β -ol-3,20-dione, 2,5% s 5 β -Pregnan-3 α -ol-20-one a \leq 0,1% s pregnanediolem, androstenedionem a kortikosteronem.

Zkřížená reakce pro estradiol-17 β protilátku byla 100% s estradiolem, 3,3% s estronem, 1,0% s testosteronem a androstenedionem, 0,8% s progesteronem a \leq 0,1% s kortizolem a dihydrotestosteronem.

3.3.2.2 Ředění protilátek a konjugátů

Protilátky: supernatantová frakce byla ředěna v poměru 1:10 v solném pufru. Pro přípravu roztoku jsme použili 200 μ l neředěných protilátek daného hormonu a přidali jsme 1,5ml coating (vazebného) pufru. Poté jsme alikvotně odebrali 50 μ l do ependorfeek a zamrazili, následně byly takto připravené protilátky použity k potažení MTP.

Konjugáty: jednalo se o HRP (křenová peroxidáza) enzym. Přítomnost steroidu (progesteronu nebo estrogenu) je viditelná po použití konjugátu, kdy za použití hydrogen peroxidázy jako oxidačního činidla dochází k oxidaci steroidu HRP enzymem, který je následně detekovatelný spektrofotometricky. Koncentrace steroidů byla determinována měřením absorbance každého vzorku. Použili jsme 5 μ l neředěného konjugátu pro estrogen nebo progesteron a přidali jsme 495 μ l EIA (testovacího) pufru k rozředění 1:100. Takto naředěné konjugáty byly uchovávány při teplotě 4 $^{\circ}$ C.

3.3.2.3 Příprava standardů steroidů

Pro přípravu vazebného pufru (stock solution) jsme odvážili 1,0mg steroidu na analytických vahách a přidali 10,0ml 96% etanolu (Kulich s.r.o., Česká republika).

Rozsah standardní progesteronové křivky začínal na 4,9pg a končil na 5000pg/jamku. Standardní řada pro stanovení metabolitů estrogenu byla připravena v rozmezí od 312,5 pg/jamku do 0,15 pg/jamku. Standardy byly použity k vytvoření standardní křivky, na jejímž základě byly následně měřeny koncentrace extrahovaných vzorků vzhledem k jejich hodnotě absorbance. Rozsah koncentrací přesně korespondoval s protokolem propočítaným od Coralie Munro pro koncentraci steroidních metabolitů i s údaji v publikacích zabývajících se měřením steroidů ve výkalech primátů. Např. studie Barelli (2007) na gibonech larech (*H. lar*) udává hodnoty pro metabolit estrogenu okolo 20 – 30 ng/g a pro metabolity progesteronu okolo 1600ng/g.

3.3.2.4 Potažení mikrotitrační destičky (MTP) protilátkami a konjugáty

Mikrotitrační destičky byly potaženy (50 μ l/1 jamka) progesteron - polyklonálními protilátkami v poměru 1:1600 a estrogen polyklonálními látkami v poměru 1: 32000 a inkubovány 24hod v lednici při teplotě do 2°C. Po inkubaci byla každá destička omyta v EIA omývacím pufru (250 μ l/MTP) (0,5ml Tween 20 + 2,5 l deonizované vody) a řádně vyklepány do sucha všechny jamky na destičce.

Následně byla MTP potažena připravenými kontrolními vzorky – EIA pufr, standardy a extrahovanými vzorky, každý extrahovaný vzorek výkalu v poměru 1:10 (50 μ l/1 jamka). V případě nízké koncentrace hormonů ve vzorku (tj. nebyla naměřená hodnota při ředění 1:10) bylo použito ředění vzorků 1:2. Poté byl přidán konjugát v množství 50 μ l/1 jamku (ředění konjugátu 1:100 pro oba steroidy v EIA pufru). V rámci kompetitivní enzymové imunoreakce byl použit *label* s křenovou peroxidázou v ředění 1:800000 a byla také sledována zkřížená reaktivita progesteronových protilátek. Pro sledování zkřížené reaktivity estrogenových protilátek byl v rámci kompetitivní enzymové imunoreakce použit *label* s křenovou peroxidázou v ředění 1:100000.

3.3.2.5 Zastavení barevné reakce

Potažené MTP byly inkubovány a vortexovány cca 24hod v lednici. Po inkubaci streptavidin avidin peroxidázou pro znásobení imunoreakce a opětovném omytí a vysušení MTP byl přidán substrát (30ml acetátu sodného s 500 μ l 0,4% TMB a 100 μ l 0,6% H₂O₂/ MTP) a dle vývoje zabarvení (v průměru 30 – 60 minut) byla reakce zastavena přidáním 50 μ l 2M roztokem kyseliny sírové v každé jamce MTP.

3.3.2.6 Výsledky analýz – spektrofotometrické čtení MTP

Finálním krokem bylo provedení determinace optické hustoty fotometrickým měřením při nastavení vlnové délky 450nm pomocí MTP reader Biotec©.

Všechna stanovení hormonů byla prováděna duplicitně pro výpočet koeficientu variability. První dvě jamky bez barvy na MTP (blank wells) sloužily ke kalibraci. Kontrolní vzorky indikovaly dobu zastavení barevné reakce. Následovaly standardy k nastavení kalibrační křivky a extrahované vzorky.

Po automatickém promíchání MTP na readeru a přečtení spektrofotometricky absorbance, byla následná data generována z programu GEN5.

Pro kvantifikaci byla vygenerována kalibrační křivka sestavená na základě optické hustoty hodnot získané ze standardů. Poté byla změřena absorbance a výsledné duplicitní hodnoty standardů, kontrolních vzorků a extrahovaných vzorků byly zprůměrovány. Pro každý vzorek nesměl variační koeficient přesáhnout 20%. V případě vyšší variability, musely být vzorky analyzovány a změřeny znovu.

Kalibrační křivka (vytvořená ze standardů) byla výsledkem sigmoidálních kalibračních křivek jako reakce na množství použitých látek a byla vygenerována pomocí GEN5 softwaru, který je schopný vytvářet čtyřparametrové logistické aproximace křivky (4-PL). Naměřené koncentrace analyzovaných/extrahovaných vzorků byly stanoveny interpolací z kalibrační křivky. Z transformace *log* křivky na základě standardních hodnot, byla absorbance měřených párových jamek převedena na koncentraci. Nelineární regresní analýza byla vybrána jako nejlépe charakterizující tvar křivky, na základě formulace: $y = (A-D)/(1+(x/C)^B)+D$, kde y = průměrná hodnota koncentrace mezi párovými jamkami daného vzorku; x = koncentrace vzorku; A, B, C,

D = naměřená koncentrace standardů (vše v jednotkách v pg/μl). Na závěr bylo potřeba přepočítat absorbanci v pg/μl na koncentraci steroidů v ng/g výkalů (Heistermann, 2011):

$$[c]^a = 10^b \times (\text{průměrná hodnota})^c \times 5000^d / 50^e \times (\text{hmotnost vzorku})^f \times 1000^g$$

a: koncentrace v ng/g

b: ředění vzorku 1 :10

c: ELISA reader hodnota v pg/μl

d: ředění během extrakce steroidu (5ml)

e: 50μl daných do každé jamky

f: hmotnost extrahovaného vzorku (výkalu) v g

g: převod pg na ng

3.4 Statistické analýzy

Do studie byla zahrnuta všechna zvířata ve všech věkových kategoriích (juvenilové 0 - 4 roky, subadulti 4 – 6 let, adulti > 6 let) a to z důvodu dlouhého reprodukčního cyklu a množství zvířat chovaných v zoologických zahradách. Doba vzorkování se lišila u jednotlivých zvířat od 2,2 měsíců do 3 let, podle možnosti sběru dané zoologické zahrady.

Počet zvířat z jednotlivých zoo včetně rozdělení dle pohlaví, věku a informací o složení skupiny a zoo udává Příloha č. 1.

Všechna data byla analyzována pomocí SAS system verze 9.4 (SAS Institute Inc.) Pro jednotlivé cíle práce byl použit zobecněný lineární smíšený model (GLMM, Proc Mixed).

GLMM byl budován tak, že do něj byly vloženy efekty, které jsme predikovali, že budou mít vliv. Poté byly k modelu postupně přidávány další pevné faktory. Výsledky jsou uváděny v podobě predikovaných hodnot, tedy hodnot statisticky ošetřených od vlivu všech ostatních faktorů v daném modelu.

Pro kategoriální proměnné zařazené do GLMM jako pevný efekt, byly vypočteny průměry nejmenších čtverců (LSMEANS) a detailní rozdíly byly testovány pomocí t-testu s Tukey-Kramerovou adjustací pro mnohonásobná srovnání.

3.4.1 Vliv pohlaví, druhu a prostředí na výši koncentrace hormonů

Základním předpokladem pro statistickou analýzu bylo, že se výše koncentrace hormonů liší mezi samci a samicemi, ale neexistují mezidruhové rozdíly v koncentracích hormonů mezi dospělými jedinci. Dalším faktorem, který může ovlivnit koncentraci hormonů, bylo chovatelské zařízení (ZOO: Asson, Bojnice, Bratislava, Chleby, Eskulstina, Jihlava, Liberec, Ljubljana, Lyon, Mulhouse, Olomouc, Ostrava, Plzeň, Ústí n. L., Varšava). Pevným efektem v prvním modelu bylo pohlaví jedince (samec / samice). Ve druhém modelu byl pevným efektem druh a chovatelské zařízení (ZOO). Závisle proměnnou byly koncentrace progesteronu a estrogeneru.

3.4.2 Vliv březosti na koncentraci hormonů u samice a samce

Základním předpokladem bylo, že koncentrace hormonů u březích samic budou několikanásobně vyšší než u nebřezích dospělých samic, a stav březosti samice (březí / nebřezí) ovlivní i koncentraci hormonů u samce – otce. V prvním modelu byl logaritmovaný věk samice nestován v rámci faktoru březosti samice.

V druhém modelu byl logaritmovaný věk samce - otce nestován v rámci faktoru březosti samice.

3.4.3 Koncentrace hormonů ovlivněné složením skupiny

Giboni zahrnutí v této studii byli chováni v rozdílně sestavených chovných skupinách: rodina s mláďaty (FA), jeden rodič s mláďaty (PO), chovný pár bez mláďat (P). Základním předpokladem bylo, že koncentrace hormonů se budou lišit mezi jednotlivými skupinami. Jako pevný efekt byly použity tyto faktory: věk a složení skupiny (FA, PO, P). Závisle proměnnou byly koncentrace hormonů (progesteronu a estrogeneru). Konstruovali jsme GLMM tak, že jsme zařadili do modelu složení skupiny. Postupně pak byl přidán věk jako další pevný faktor a nakonec interakce obou faktorů věk*složení skupiny.

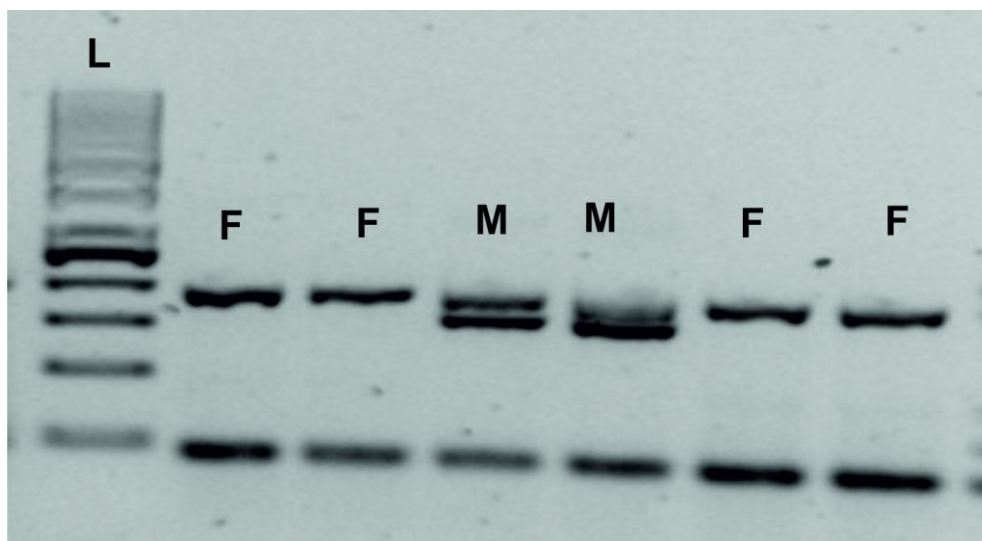
4 Výsledky

4.1 Stanovení pohlaví pomocí PCR analýzy

Elektroforetická separace ukázala u samičího pohlaví pouze fragment o velikosti 194 bp odpovídající genu AMEL a u samčího byl navíc fragment o velikosti 164 bp odpovídající genu SRY (Obr. č. 8.)

Procedura byla zopakována 3 krát pro každý vzorek a k negaci kontaminace byl použit “No Template Control”, tj. kontrolní negativní vzorek. Finální výsledky analýz jsou shrnuty v Tabulce č. 3.

Obr. č. 8 Příklad determinace (M – samec, F – samice, L 50 bp žebřík)



Tabulka č. 3 Informace o vzorkovaných gibonech rodu *Nomascus* včetně výsledků

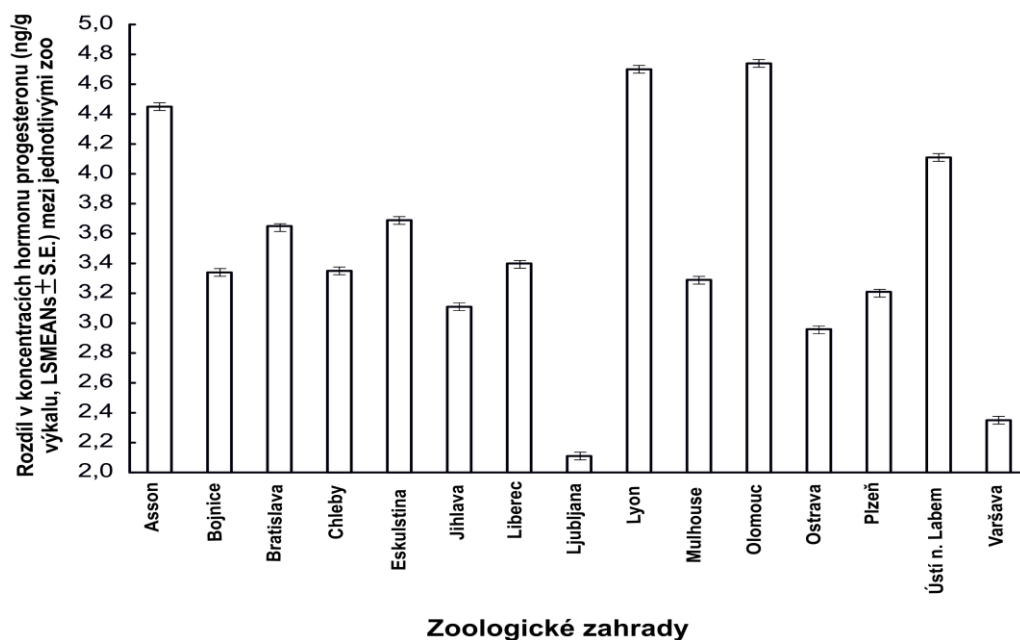
Č.vz.	druh	zoo/stát	věková kateg.*	počet vzorků	Určení pohlaví dle:		
					ZOO- začátek studie	Multiplex PCR	ZOO - ukončení studie
1	<i>N. gabriellae</i>	Bojnice/SK	dospělý	3	samec	samec	samec
2	<i>N. gabriellae</i>	Bojnice/SK	dospělý	1	samec	samec	samec
3	<i>N. gabriellae</i>	Jihlava /CZ	dospělý	1	samec	samec	samec
4	<i>N. leucogenys</i>	Liberec/CZ	mládě	1	neznámé	samec	samec
5	<i>N. leucogenys</i>	Liberec/CZ	dospělý	1	samice	samice	samice
6	<i>N. leucogenys</i>	Liberec/CZ	mládě	1	samec	samec	samec
7	<i>N. leucogenys</i>	Mulhouse/FR	mládě	1	neznámé	samice	samice
8	<i>N. gabriellae</i>	Mulhouse/FR	mládě	2	neznámé	samec	samec
9	<i>N. siki</i>	Mulhouse/FR	mládě	2	neznámé	samec	samec
10	<i>N. gabriellae</i>	Olomouc/CZ	mládě	1	samec	samec	samec
11	<i>N. gabriellae</i>	Olomouc/CZ	mládě	1	neznámé	samice	samice
12	<i>N. gabriellae</i>	Olomouc/CZ	dospělý	1	samice	samice	samice
13	<i>N. gabriellae</i>	Olomouc/CZ	mládě	1	neznámé	samec	samec
14	<i>N. leucogenys</i>	Ostrava/CZ	mládě	3	neznámé	samec	samec
15	<i>N. gabriellae</i>	Warszawa/PL	mládě	1	samec	samec	samec
16	<i>N. gabriellae</i>	Warszawa/PL	dospělý	1	samec	samec	samec

4.2 ELISA – analýza koncentrace steroidních hormonů

4.2.1 Vliv pohlaví, druhu a prostředí na výši koncentrace hormonů

Výsledky neprokázaly signifikantní vliv pohlaví na výši koncentrací ani progesteronu ($F_{(1,48.2)} = 1.67, P = 0.2$), ani estrogeneru ($F_{(1,48.9)} = 0.31, P = 0.6$). U druhého modelu také nebyl prokázán signifikantní vliv druhu mezi dospělými jedinci, jak u progesteronu ($F_{(2,32.4)} = 1.73, P = 0.2$), tak u estrogeneru ($F_{(2,32.9)} = 0.95, P = 0.4$). Po přidání pevného faktoru „chovatelské prostředí“ (ZOO) výsledky vykazovaly přiblížení se k hladině významnosti (Graf č. 1; $F_{(14,29.9)} = 2.23, P = 0.03$) u progesteronu, u estrogeneru a vlivu ZOO na jeho výši nebylo dosaženo hladiny významnosti ($F_{(14,29.4)} = 1.55, P = 0.2$).

Graf č. 1 Rozdíly v koncentracích hormonu progesteronu (ng/g výkalu, LSMEANs ± S. E.) mezi jednotlivými zoo



Pro doplnění informací jsou uvedeny průměrné hodnoty metabolitů progesteronu a estrogeneru v ng/g výkalu u všech věkových skupin gibbonů zahrnutých do studie vypočítané ze všech analyzovaných vzorků (Tabulka č. 4, 5, 6).

Tabulka. č. 4 Průměrné koncentrace (\pm standardní odchylka) metabolitů progesteronu a estrogeneru u *Nomascus gabriellae*, vypočítané z celkového množství vzorků dané věkové kategorie

Pohlaví	samice	samice	samice	samec	samec	samec
věková kategorie	juvenil	subadult	adult	juvenil	subadult	adult
hladiny hormonů	ng/g	ng/g	ng/g	ng/g	ng/g	ng/g
průměr. estrogen	7,7 \pm 6,3	0,4 \pm 0,1	5,4 \pm 8,2	6,6 \pm 9,8	4,6 \pm 3,4	2,1 \pm 2,6
průměr.progesteron	8,5 \pm 7,4	8,1 \pm 4,2	100,1 \pm 134,1	48,5 \pm 37,0	65,4 \pm 45,9	61,4 \pm 81,0

Tabulka č. 5 Průměrné koncentrace (\pm standardní odchylka) metabolitů progesteronu a estrogeneru u *Nomascus leucogenys*, vypočítané z celkového množství vzorků dané věkové kategorie

pohlaví	Samice	samice	samice	samec	samec
věková kategorie	juvenil	subadult	adult	juvenil	adult
hladiny hormonů	ng/g	ng/g	ng/g	ng/g	ng/g
průměr. estrogen	3,1 \pm 4,1	3,4 \pm 4,4	5,5 \pm 9,1	7,0 \pm 1,8	5,4 \pm 5,4
průměr.progesteron	90,5 \pm 106,4	58,2 \pm 74,1	98,2 \pm 100,4	64,7 \pm 23,9	44,9 \pm 46,2

Tabulka č. 6 Průměrné koncentrace (\pm standardní odchylka) metabolitů progesteronu a estrogeneru u *Nomascus siki*, vypočítané z celkového množství vzorků dané věkové kategorie

pohlaví	samice	samec	samec
věková kategorie	adult	subadult	adult
hladiny hormonů	ng/g	ng/g	ng/g
průměr. estrogen	2,2 \pm 1,7	1,3 \pm 1,1	2,5 \pm 1,5
průměr.progesteron	19,4 \pm 13,8	11,0 \pm 1,8	15,2 \pm 4,3

Vzhledem k zastoupení malého počtu zvířat i délce odběru u gibbonů siki (*N. siki*), se jedná o značně orientační údaje.

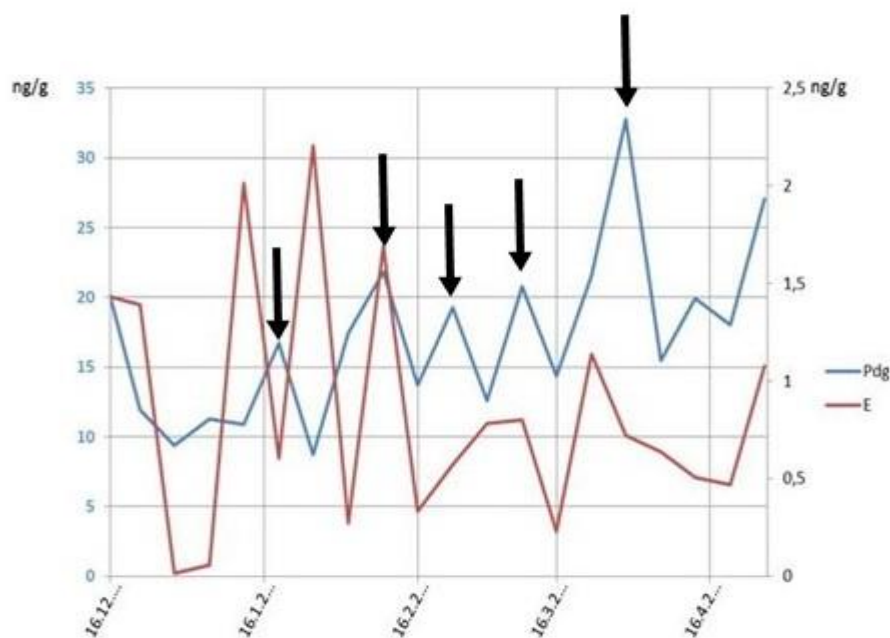
Výsledné koncentrace hormonů byly u jedinců s min. pravidelným odběrem 2,5 měsíce graficky zpracovány pro prokázání pravidelného cyklu u reprodukčních samic nebo samic

v pubertě a pro porovnání hladin hormonů s ostatními věkovými kategoriemi vč. samců (Příloha č. 2).

4.2.2 Délka ovariálního cyklu u dospělých samic

Délka ovariálního cyklu samic byla definována jako počet dní od první zvýšené hodnoty metabolitu progesteronu až po další první zvýšené hodnoty metabolitu progesteronu následujícího cyklu (Graf č. 2). Hladiny estrogenů byly brány jako doplňující hodnoty ke stanovení ovariálního cyklu. Samice byly vzorkovány průměrně 1,2 vzorku týdně.

Graf č. 2 Ukázka výpočtu délky ovariálního cyklu na základě počtu dnů mezi zvýšenými hodnotami progesteronu (černá šipka).



PdG = pregnadiol-3-glucuronid (progesteron) **E** = 17 β estradiol (estrogen)

Délka ovariálního cyklu pro dospělé samice *N. gabriellae* byla stanovena na **25,8 \pm 4,5 dne** (průměr \pm směrodatná odchylka) podle hladin metabolitu **progesteronu**. Délka ovariálního cyklu na základě hodnot metabolitů **estrogenu** byla stanovena na **24,8 \pm 4,0 dne**.

Délka ovariálního cyklu pro dospělé samice *N. leucogenys* byla stanovena na **26,3 ± 3,4 dne** podle hladin metabolitu **progesteronu**. Délka ovariálního cyklu na základě hodnot metabolitů **estrogenu** byla stanovena na **26,0 ± 3,9 dne**.

Vzhledem k výpočtu délky ovariálního cyklu na základě odběru vzorků pouze dvou dospělých samic *N. siki* po dobu 2,5 měsíce je údaj o délce ovariálního cyklu velmi orientační a to **27 - 28 dní** dle hladiny metabolitů **progesteronu**, dle hladin metabolitů **estrogenu** vychází na **24 dní**.

4.2.3 Stanovení březosti u samic a výpočet koncentrace hormonů, vliv březosti samice na koncentraci hormonů u samce

U čtyř samic *N. gabriellae* byla detekována březost, kdy **nejvyšší koncentrace metabolitu hormonu progesteronu** byla naměřena u samice Rony (ZOO Olomouc): **3516,7 ng/g** výkalů; u samice Miloš (ZOO Olomouc): **2942,1 ng/g** výkalů; u samice Zlaty (ZOO Jihlava): **263,9 ng/g** výkalů a u samice Bonii (ZOO Varšava): **154,0 ng/g** výkalů.

U dvou samic *N. leucogenys* byla také detekována březost a nejvyšší koncentrace metabolitu progesteronu byla u samice Wen-Wen (ZOO Liberec) pouze **145,1 ng/g** výkalů. Druhá samice, Malou (ZOO Eskilstuna) měla nejvyšší naměřené hodnoty v době březosti **516,2 ng/g** výkalů.

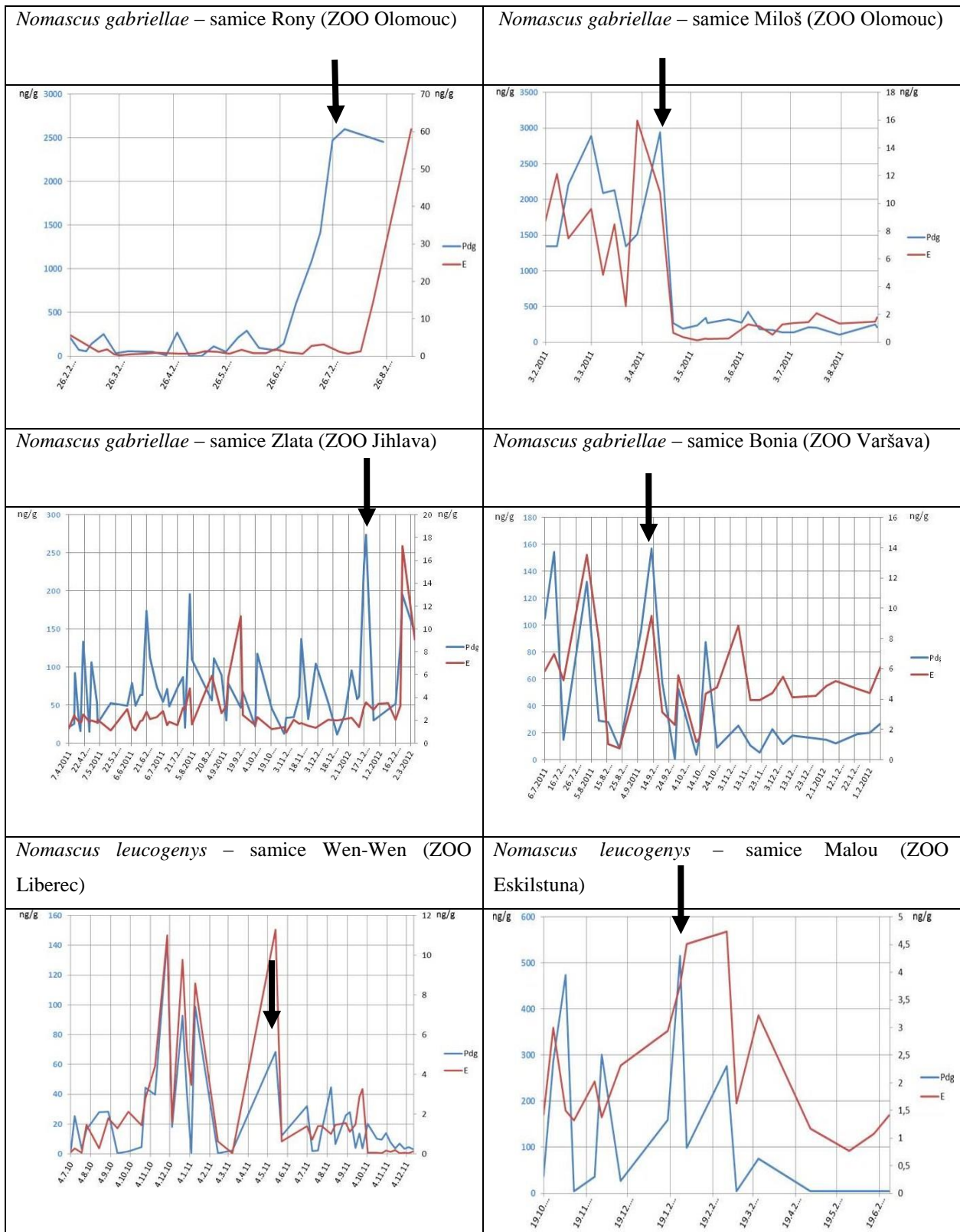
Naměřené hodnoty v období březosti oproti průměrným hodnotám metabolitů progesteronu během ovariálního cyklu byly vyšší 1,4 – 17,9 x (Tabulka č. 7 a č. 8).

Naměřené nejvyšší hodnoty metabolitů estrogenů u březích samic se pohybovaly od 4,8ng/g do 60,7ng/g výkalů a navýšení bylo v rozpětí 1,4 – 9,9x (Tabulka č. 7 a č. 8).

Tabulka č. 7 Hodnoty hormonů (ng/g výkalu) u březích samic

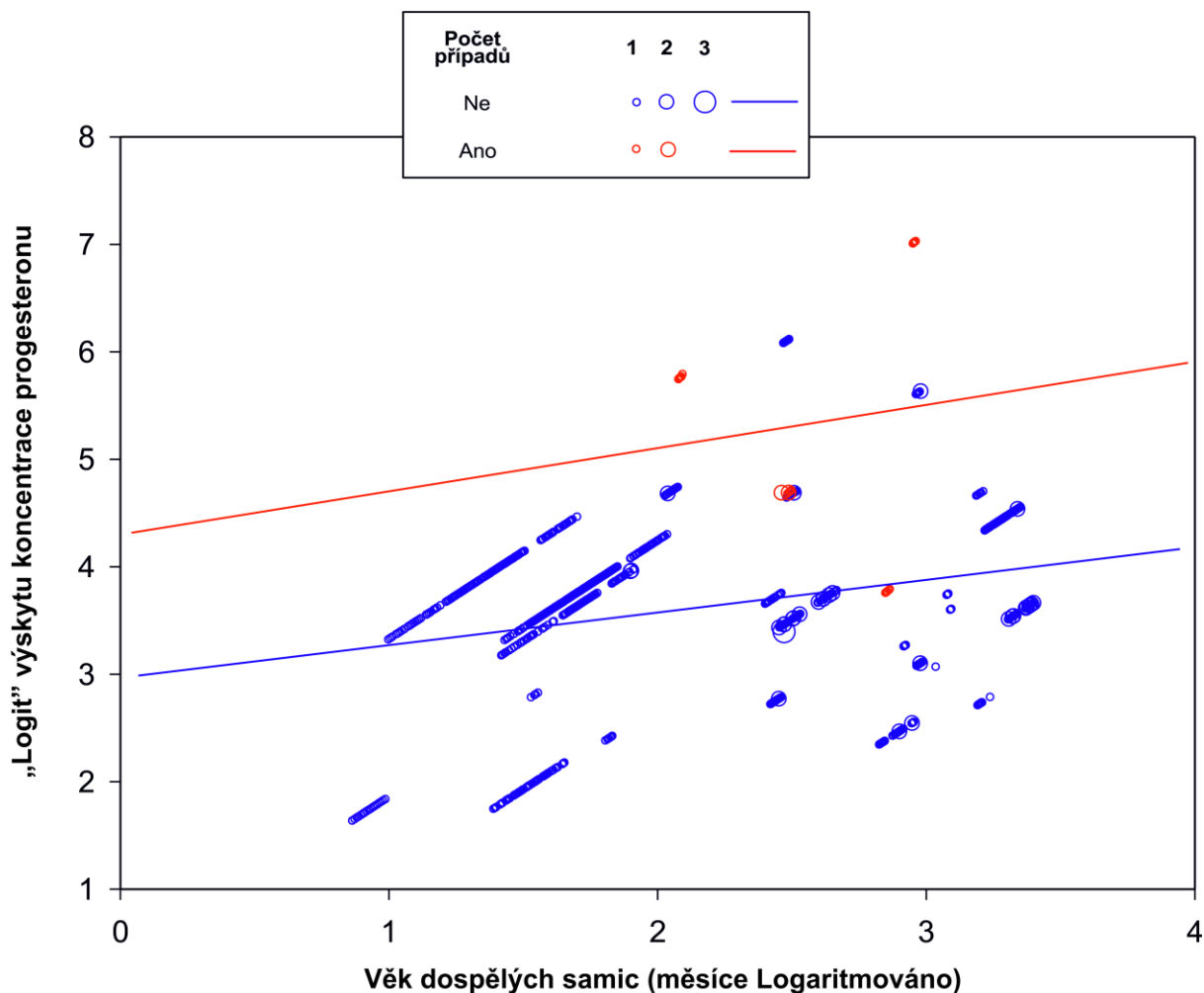
Jméno	Druh	Nejvyšší hladina progesteronu (ng/g)	Zvýšení hladiny progesteronu	Nejvyšší hladina estrogeneru (ng/g)	Zvýšení hladiny estrogeneru
Rony	<i>N. gabriellae</i>	3516,7	17,9x	60,7	9,9x
Miloš	<i>N.gabriellae</i>	2942,1	8,6x	16,0	9,2x
Zlata	<i>N.gabriellae</i>	263,9	1,4x	12,7	1,6x
Bonia	<i>N.gabriellae</i>	154,0	3,3x	13,5	1,4x
Wen-Wen	<i>N. leucogenys</i>	145,1	2,0x	11,3	2,5x
Malou	<i>N. leucogenys</i>	516,2	16,9x	4,8	2,3x

Tabulka č. 8 Grafické znázornění koncentrace hormonů (ng/g výkalu) u březích samic, černá šipka označuje porod

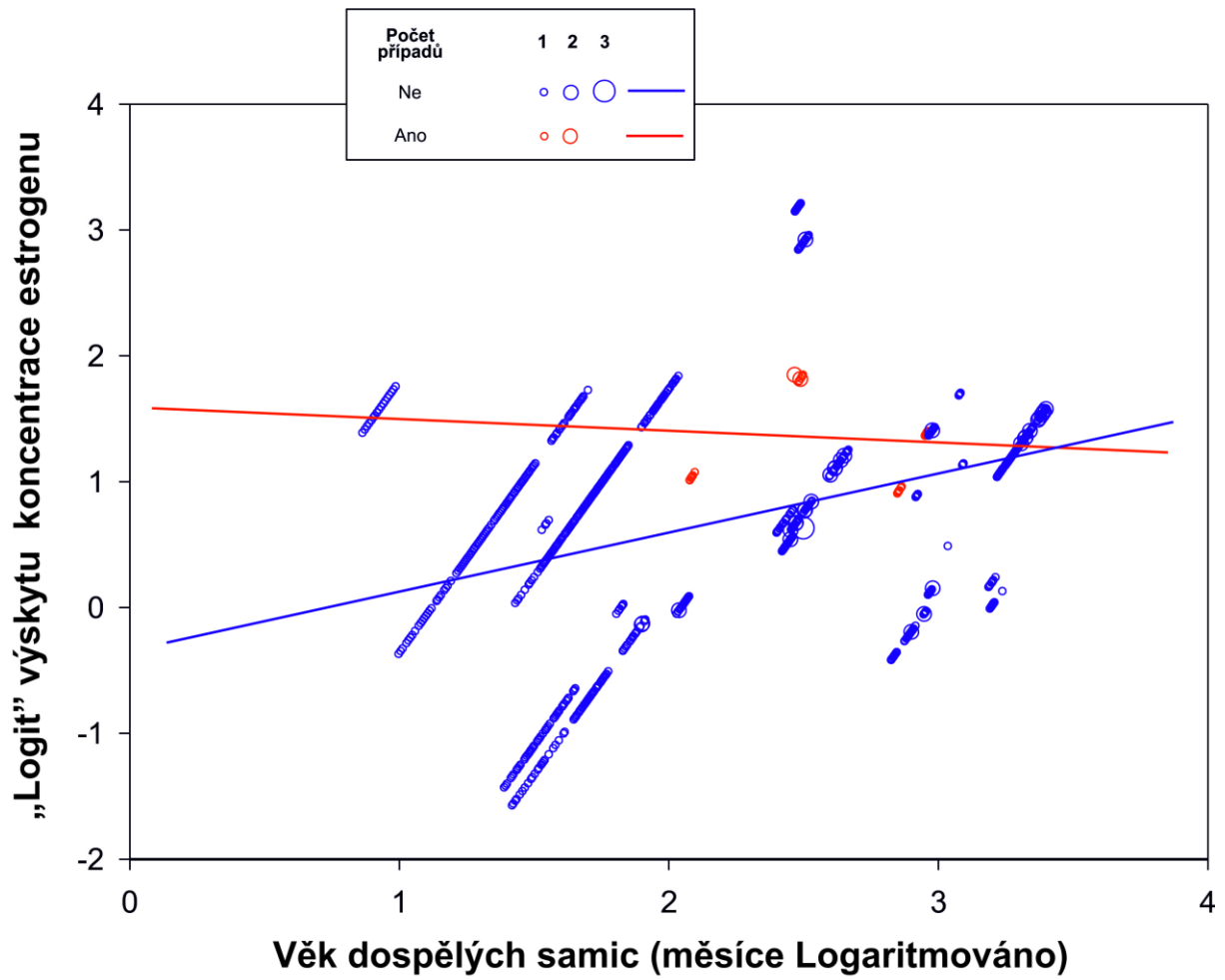


V rámci faktoru březosti samice byl ve statistickém modelu nestován logaritmovaný věk samice do stavu březosti. Výsledky ukazují signifikantní vliv březosti na výši koncentrace progesteronu ($F_{(2,219)} = 37.69$, $P < 0.0001$) a estrogeneru ($F_{(2,602)} = 68.46$, $P < 0.0001$), kdy s přibývajícím věkem samice se zvyšuje koncentrace progesteronu i estrogeneru, jak u březích samic, kde jsou hodnoty hormonů vyšší, tak i u nebřezích samic, kdy hodnoty stoupají s jejich věkem (Graf č. 3 a č. 4).

Graf č. 3 Koncentrace hormonů progesteronu (ng/g výkalů) u dospělých samic v závislosti na jejich věku (březí samice červeně, nebřezí samice modře)

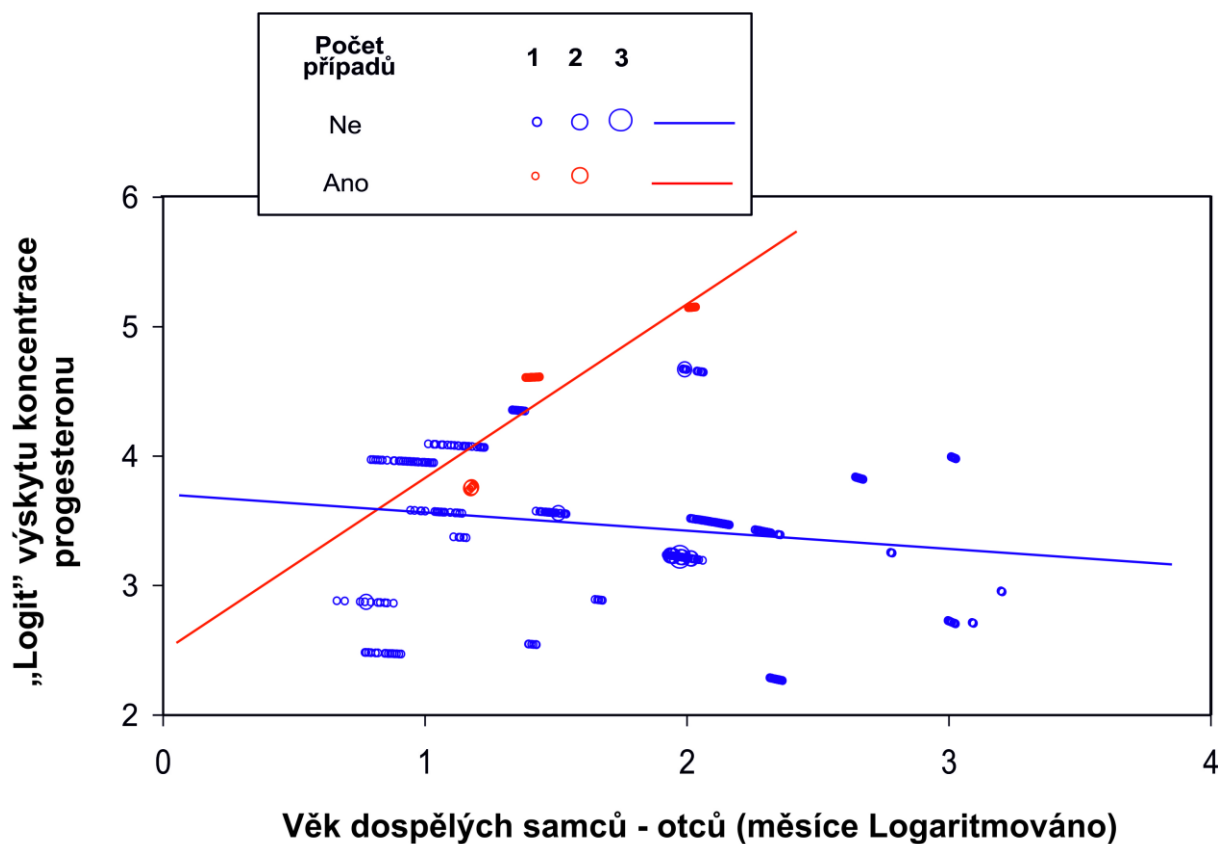


Graf č. 4 Koncentrace hormonů estrogenu (ng/g výkalů) u dospělých samic v závislosti na jejich věku (březí samice červeně, nebřezí samice modře)



V obdobném modelu byl logaritmovaný věk samce - otce nestován v rámci faktoru březosti samice. Signifikantní výsledky byly zjištěny v případě výše koncentrace progesteronu a věku samce ($F_{(2,51.6)} = 4.35, P = 0.02$), ale nikoliv v případě výše koncentrace estrogenu ($F_{(2,52.7)} = 2.04, P = 0.1$), kdy tedy s přibývajícím věkem „reprodukčního“ samce, stoupá výše koncentrace progesteronu v době březosti a narození mláďete, které jsou opět vyšší oproti ostatním samcům (Graf č. 5).

Graf č. 5 Koncentrace hormonů progesteronu (ng/g výkalů) u dospělých samců v závislosti na jejich věku a faktoru březosti samice



4.2.4 Koncentrace hormonů u novorozence

V jednom případě byly získány vzorky od mláděte **6 dní po narození** (ZOO Bojnice, samec), kdy bylo možné zaznamenat pravděpodobný přenos hormonů mlékem a průměrná hodnota metabolitu **progesteronu** byla **432,5 ± 54,5ng/g** výkalu a u metabolitu **estrogenu** **69,2 ± 37,5ng/g** výkalu. Nejnižší hodnoty během měsíčního odběru vzorků se pohybovaly u metabolitu progesteronu okolo 380,2ng/g, nejvyšší hodnota byla 522,0 ng/g. U metabolitu estrogenu byla nejnižší hodnota 18,3 ng/g a nejvyšší 109,7 ng/g. Z toho důvodu i krátké doby vzorkování bylo toto mládě vyřazeno z celkové statistiky, nicméně jsou tyto ojedinělé hodnoty prvním důkazem o hormonálním profilu po narození mláděte.

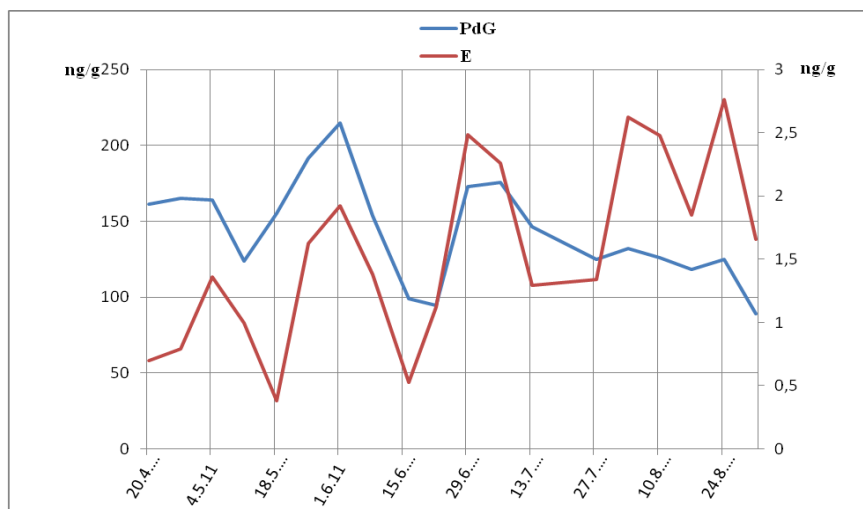
K porovnání je možné použít další druhé nejmladší mládě ve studii, **4 měsíční samici** ze ZOO Ostrava, kde můžeme předpokládat také souvislost výše hladin hormonů s kojením.

V porovnání k novorozenci z Ostravy, činila průměrná hodnota metabolitu progesteronu během dvouměsíčního vzorkování **87,9 ± 16,5ng/g** výkalu a u metabolitu **estrogenu** **5,4 ± 5,0ng/g** výkalu. Nejnižší hodnoty během měsíčního odběru vzorků se pohybovaly u metabolitu progesteronu od 65,1ng/g , nejvyšší hodnota byla 106,5 ng/g. U metabolitu estrogenu byla nejnižší hodnota 1,6 ng/g a nejvyšší 16,4ng/g.

4.2.5 Koncentrace hormonů u gibbonů s antikoncepcí

Do studie hormonálních analýz se zapojila i ZOO Hannover, která odebírala od 20. 4. 2011 do 31. 8. 2011 vzorky od dospělé samice *N. gabriellae* s aplikovanou antikoncepcí od 13. 3. 2011. Koncentrace hodnot hormonů se nelišily od ostatních dospělých samic, ale jak ukazuje Graf č. 6, vzhledem k vlivu antikoncepce dochází k uniformitě v koncentracích progesteronu. Tato samice nebyla zahrnuta do celkového statistického hodnocení.

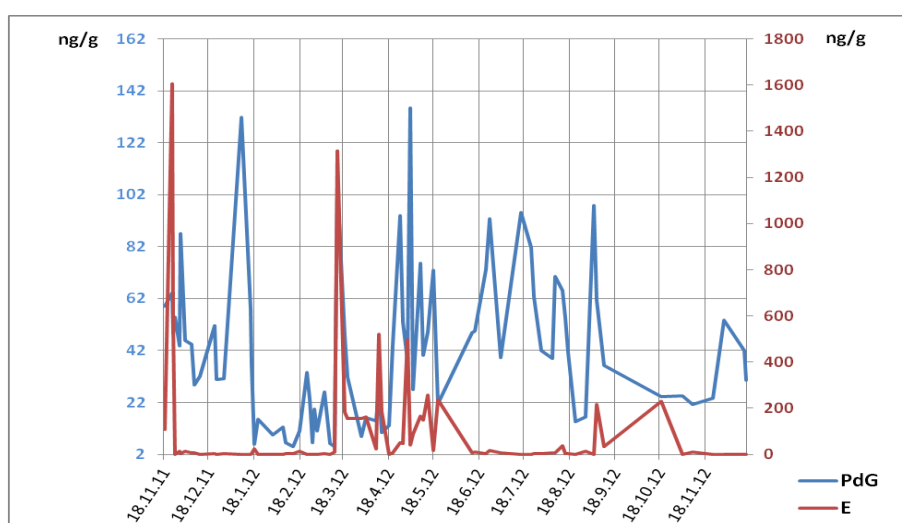
Graf č. 6 Koncentrace hormonů progesteronu a estrogeneru (ng/g výkalů) u samice Robin (ZOO Hannover)



PdG = pregnadiol-3-glucuronid (progesteron) **E** = 17 β estradiol (estrogen)

Druhým případem byl odebíraný dospělý samec *N. leucogenys* ze ZOO Plzeň, kterému byla aplikována z chovatelských důvodů antikoncepce 11.10.2011 a 14.3.2011 (Suprelorin®). Graf č. 7 znázorňuje extrémně vysoké hodnoty metabolitů estrogeneru jako následek aplikace antikoncepce a výše koncentrace hormonů ukazuje i na dobu její účinnosti. Tento samec nebyl zahrnut do celkového statistického hodnocení.

Graf č. 7 Koncentrace hormonů progesteronu a estrogeneru (ng/g výkalů) u samce Lů (ZOO Plzeň)



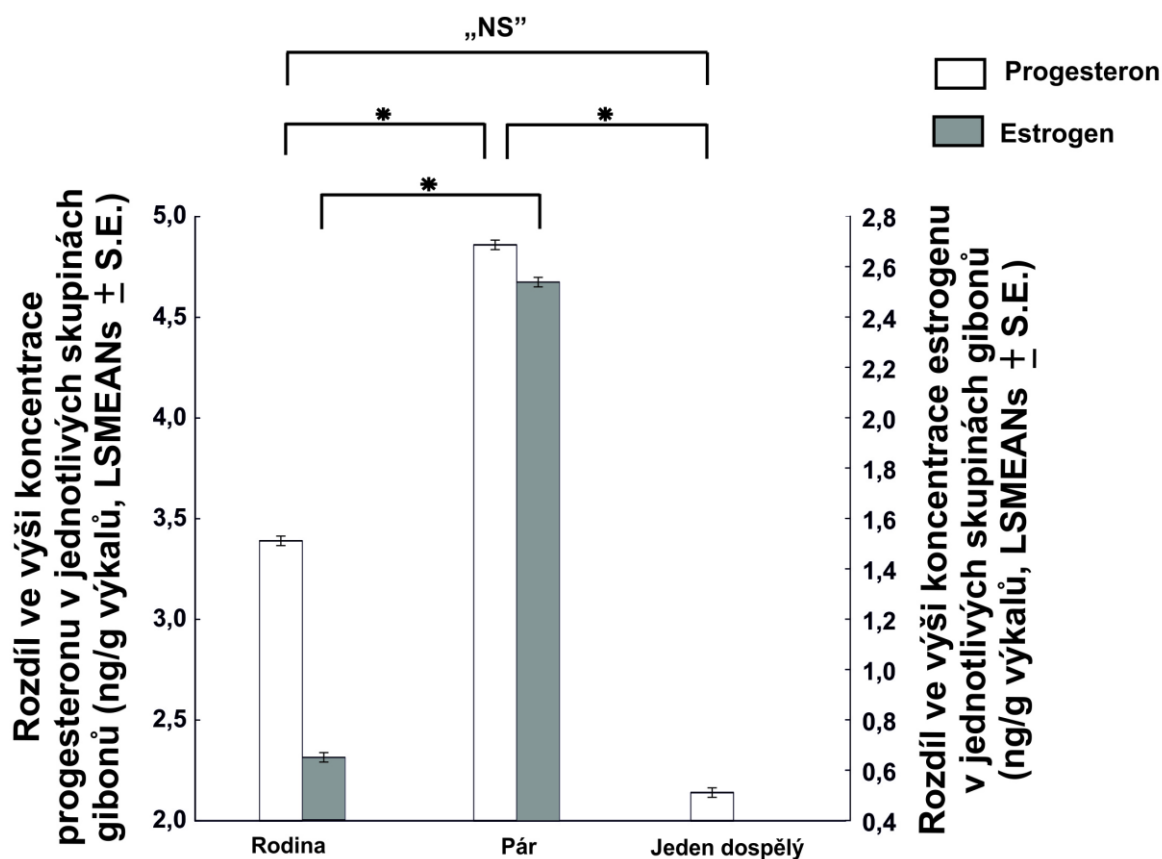
PdG = pregnadiol-3-glucuronid (progesteron) **E** = 17 β estradiol (estrogen)

4.2.6 Hodnoty koncentrace hormonů ovlivněné složením skupiny

Výsledky ukázaly významný vliv faktoru „složení skupiny“ na hodnoty progesteronu ($F_{(3,133)} = 7.72, P < 0.0001$) a estrogeneru ($F_{(3,140)} = 11.45, P < 0.0001$). Rozdíly v rámci efektu složení skupiny jsou znázorněny v Grafu č. 8.

Vliv věku jedince byl významný pouze v případě hodnot estrogeneru ($F_{(1,1444)} = 27.18, P < 0.0001$), ale ne v případě progesteronu ($F_{(1,114)} = 0.36, P = 0.6$).

Graf č. 8 Rozdíly ve výši koncentrace progesteronu a estrogeneru v jednotlivých skupinách gibbonů (ng/g výkalu, LSMEANS \pm S. E.)



* $P < 0.0001$ NS $P < 0.1$

V případě interakce obou efektů, věku a složení skupiny, byly zjištěny signifikantní hodnoty pro progesteron ($F_{(3,100)} = 8.87, P < 0.0001$) i estrogen ($F_{(3,106)} = 13.29, P < 0.0001$).

4.2.7 Nástup pohlavní dospělosti u samic gibonů a změna barvy srsti

Během studie byly odebrány vzorky výkalů cekem od 4 subadultních samic, u kterých bylo možné zaznamenat věk nástupu ovariálního cyklu. Doplňující informace o změně barvy srsti byly poskytnuty jednotlivými zoologickými zahradami na základě jejich evidence o přebarvování samic. Pro vyhodnocení vzájemných souvislostí byly posouzeny i sociální faktory ve formě složení chovné skupiny a případné přítomnosti jiné samice a také finální věk přebarvení samice do béžové barvy. Souhrnné informace s výsledky vč. průměrné délky ovariálního cyklu (OC) udává Tabulka č. 9.

Průměrné hodnoty metabolitů progesteronu se nelišily před, ani po nástupu OC u všech samic, ale průměrné hodnoty metabolitu estrogenu vzrostly po nástupu OC (Tabulka č. 9).

U dvou samic ze čtyř nástup ovariálního cyklu nekorespondoval se změnou barvy. Změna barvy srsti naznačovala ve výsledcích souvislost se změnou prostředí. Příklad přebarvení barvy srsti u jedné ze samic zobrazuje Obr. č. 9.

Tabulka č. 9 Biologická data získaná od subadultních samic rodu *Nomascus*

ZOO	Ústí n. L./CZ		Liberec/CZ a Asson/F	Bratislava/SK
Druh	<i>Nomascus leucogenys</i>		<i>Nomascus leucogenys</i>	<i>Nomascus gabriellae</i>
Jméno	Beaut	Faranga	Shantí	Linda
Datum narození	13/10/06	31/08/08	18/05/06	27/02/07
Doba vzorkování	12/ 10 – 10/ 13	08/ 12 – 02/ 14	07/10 – 04/12 a 08/12 – 03/13	05/ 11 – 05/ 12
Počet vzorků	113	51	56 (CZ) + 21 (F)	46
Složení skupiny	pár	jen s matkou	matka, otec, sourozenci (CZ); se samcem (F)	jen s otcem
Chovatelské zařízení	vedle matky s dcerou	vedle sestry chované v páru	žádní giboni v sousedství	žádní giboni v sousedství
Barva srsti během nástupu OC*	šedoběžová	černá	černá	šedoběžová
Věk v době nástupu OC* (roky)	4.9	4.8	5.8	4.6
Délka OC* ve dnech /progesteron	27.1±4.9	24.0±3.5	24.6±4.9	26.3±3.9
Délka OC* ve dnech / estrogen	28.1±4.8	27.7±5.2	25.8±5.3	29.3±1.5
Zvýšení estrogenu po nástupu OC*	3x	1.9x	3.2x	1x
Věk samice v době finálního přebarvení do béžové barvy (roky)	6.8	5.6	7.1	4.9
Místo finálního přebarvení	v jiném výběhu (CZ)	ZOO Lyon (F)	ZOO Asson (F)	ve výběhu s otcem (SK)

*OC = ovariální cyklus

Obr. č. 9 Průběh přebarvování u samice Beaunt, nar. 13. 10. 2006 (ZOO Ústí n. L.)



5 let = nástup ovariálního cyklu

6let

7 let

foto Tereza Šindelářová

5 Diskuze

5.1 Stanovení pohlaví u gibonů rodu *Nomascus*

V této studii bylo poprvé determinováno pohlaví u gibonů rodu *Nomascus* použitím neinvazivní metody PCR.

Jak bylo zmíněno, je zde několik faktorů, které znesnadňují určení pohlaví u mládřat těchto gibonů, a to především stejná barva srsti u nedospělých samců i samic, kdy obě pohlaví mají barvu srsti černou jako otec (Mootnick 2006; Mootnick et Fan, 2011). V zoologických zahradách se bohužel v běžné praxi využívá jen znalostí ošetřovatelů, nebo je identifikace pohlaví prováděna až při veterinárním vyšetření. Proto se objevují chyby, které komplikují následné řízení celého chovu těchto primátů (Lefaux, osob. sdělení).

Existuje několik studií popisujících stanovení pohlaví u opic, lidoopů a také gibonů při využití amplifikace SRY nebo AMEL genu (Cadamuro et al., 2015; Di Fiore, 2005). V této studii vykazovala amplifikace SRY vysokou efektivnost, ale v některých případech jsme pozorovali přednostní amplifikaci Y fragmentu. Ale i v tomto případě byl X fragment dobře viditelný na gelu Obr. č. 8). Obdobnou situaci popisuje Di Fiore (2005) u poloopic (*Strepsirrhini*) a také byla popsána u novosvětských primátů (*Platyrrhini*) (Villesen et Fredsted, 2006).

Předpokládáme, že výsledek nízké efektivity AMEL amplifikace může být problémem kvality vzorku, spíše než problémem zkoumaného taxonu. DNA izolována z výkalů neobsahuje jen cílovou DNA zkoumaných zvířat, ale také DNA střevních bakterií a potravy. Proto PCR reakce se “vzorovou” DNA izolovaná z takového směsného materiálu jako jsou výkaly, vyžaduje použití BSA, ovšem i tak je možné zachytit nespecifické fragmenty. Výsledky nebyly však tímto faktorem ovlivněny, naopak, poukazují na potencionální využití multiplex PCR pro běžnou praxi u druhů, kde pohlaví u mládřat není jednoznačně rozlišitelné.

5.2 Stanovení steroidních hormonů u gibbonů rodu *Nomascus* a faktory ovlivňující jejich cyklus

Výsledky analýz hormonů od 51 gibbonů v různých věkových kategoriích potvrdili informaci z předcházejících studií, že neexistuje mezidruhový rozdíl v koncentracích hormonů u dospělých jedinců (Geissmann et Anzenberger, 2009; Rafacz, 2010), avšak nebyly potvrzeny rozdíly v koncentracích progesteronu a estrogenu v rámci pohlaví, oproti tvrzení studie Rafacz (2010). Tento výsledek jen naznačuje, že pro bližší analýzu souvislostí výše koncentrace hormonů je potřeba zohlednění i vnitřních a vnějších faktorů, jako byla následná analýza vlivu chovatelského prostředí (zoo) na hormonální profil jedince (Box, 1984; Heistermann, 2011). Porovnání výše koncentrací progesteronu u všech věkových kategorií v 16ti zoologických zahradách potvrdilo vliv faktoru chovatelského zařízení, do něhož můžeme zahrnout nejenom samotné zařízení, ale i vliv ošetřovatelů a složení potravy.

Na základě provedené analýzy metabolitů progesteronu a estrogenu z výkalů gibbonů rodu *Nomascus* jsme potvrdili biologickou validitu EIA metody pro monitoring reprodukčního cyklu. Délka ovariálního cyklu stanovená z hladin metabolitů progesteronu korelovala u *N. gabriellae* s předešlými výsledky EIA analýz (Geissmann et Anzenberger, 2009; Rafacz et al., 2013) ale i s obdobně uváděnými údaji o délce ovariálního cyklu na základě vyhodnocení otoků vnějších genitálií (Bachmann et Sodano, 2001). Vzhledem k předchozí malé základně dat a ojedinělému výskytu otoku vnějších genitálií u těchto samic gibbonů, se jedná o první dlouhodobý monitoring délky ovariálního cyklu tohoto druhu gibona, využívající EIA analýzy. I přes značnou variabilitu ve věku samic a v délce doby sběru vzorků, byly hodnoty zohledněny vždy v rámci minimálně 2 cyklů samice. U samic *N. leucogenys* délka ovariálního cyklu korelovala s výsledky Rafacz et al. (2013) a korelovala i s údaji autorů uvádějících hodnoty na základě vyhodnocování menstruačního cyklu (Pocock, 1905; Fisher, 1980; Zhen, 1989), které ovšem bývá zaznamenáno ojediněle. V případě druhu *N. siki* zastoupeného v této studii, nelze z důvodu krátkého časového období sběru vzorků a malého množství jedinců (2) učinit jasný závěr. Nicméně vzhledem k taxonomické blízkosti *N. siki* s *N. leucogenys* se předpokládají totožné hodnoty ovariálního cyklu.

Doprovodnými analýzami v této studii bylo stanovení koncentrace metabolitů estrogenů. V případě gibbonů *Nomascus* pouze studie od Rafacz et al. (2012, 2013) udávají prvotní informace o hladinách těchto hormonů. Hodnoty metabolitů estrogenu naměřené v průběhu této studie byly značně variabilní, což lze přisuzovat rychlejšímu rozkladu estrogenů a následně jejich problematictější diagnostice. Wasser et al. (2000) také poukazuje na možnost mezidruhové variability v exkreci steroidních hormonů ve výkalech. I přes orientační hodnoty estrogenů v naší studii, byly výsledky také použity k výpočtu ovariálního cyklu u samic, jehož délka korelovala s výpočtem progesteronu. Nicméně se ukazuje, že pro budoucí využívání estrogenů k vyhodnocení reprodukčního cyklu je potřeba jiná metodika sběru výkalů a nelze vyloučit i rozdíly v koncentracích hormonů během dne. Současně by bylo také vhodné porovnávat výsledky od zvířat ve zcela stejném věku a ve stejné době biologicky inaktivního období v porovnání s reprodukčním obdobím.

U čtyř samic *N. gabriellae* byla během studie detekována březost a naměřeny obdobně vysoké, ale i vyšší hodnoty progesteronu, jaké uvádí předešlé studie (Rafacz, 2010; Rafacz et al., 2013). Jedna samice však vykazovala jen o 1,4x vyšší hladiny oproti průměrným hodnotám během ovariálního cyklu. U *N. leucogenys* byly detekovány dvě březí samice, z nichž jedna měla hodnoty progesteronu také jen o 1,98x vyšší. U těchto dvou samic se hodnoty koncentrací metabolitů progesteronu v době prvního trimestru nelišily od ovariálního cyklu, což může odpovídat i popsanému procesu menstruačnímu cyklu u žen v průběhu prvního trimestru těhotenství (Hasan et al., 2010, Harville et al., 2003). V tomto období *corpus luteus* produkuje progesteron, než se jeho tvorba přesune do placenty. Proto *corpus luteus* může ovlivňovat hladinu progesteronu při nedostatečně vyvinuté placentě (Csapo and Pulkkinen, 1978) nebo se může jednat i o výsledek předčasné cirkulace krevního oběhu plod-matka (Jauniaux et al., 2005).

U primátů byla popsána problematika estrogenu a to jeho zvýšená produkce během posledního trimestru např. u makaků rhesus (*Macaca mullata*), kdy placenta produkuje estrogen během celé březosti a ke konci porodu dochází ke snížení estradiolu a zvýšení estronu (Walsh et al., 1979). Obdobně popisuje zvýšení estrogenu po 60 dnech březosti u paviánů anubi (*Papio abubis*) Fortman et al. (1993) jako výsledek činnosti adrenální žlázy plodu, která se podílí na sekreci androgenních prekurzorů, tj. estradiolu (Pepe et Albrecht, 1990; Albrecht and Pepe, 1990). Z naměřených hodnot estrogenů u studovaných březích samic v této studii lze potvrdit

jejich zvýšené hodnoty (koncentrace), především v prvních týdnech březosti (Heistermann et al., 1996).

Můžeme konstatovat, že jak v případě vyhodnocení délky ovariálního cyklu, tak březosti, se pozitivně uplatnily doprovodné výsledky analýz metabolitů estrogenů, které i přes problematickou diagnostiku umožnily bezpečně stanovit fázi cyklu dospělé samice od dospělého samce.

Březost je významným faktorem ovlivňujícím koncentrace hormonů, jak prokázaly i naše výsledky, kdy se koncentrace progesteronu i estrogenu zvyšovala s věkem samice. U samců – otců byly analyzovány v souvislosti s březostí samice také zvýšené koncentrace hormonů, jak progesteronu, tak estrogenu, v korelaci s jejich věkem, což potvrzuje souvislost s otcovským chováním, popsaném prvotně u některých samců ve studii Rafacz et al. (2012). Souvislost s popsányými změnami vnitřních sociálních interakcí po narození nového potomka uvádí i Burns and Dooley (2011). Výsledkem pak je změna fyziologických hodnot, jako je tento případ analyzovaných koncentrací hormonů.

V této studii jsme také analyzovali poprvé vysoké koncentrace progesteronu a estrogenu u novorozeného mláděte jako projev přenosu hormonů přes kolostrum (Clar et al., 1992).

Také byla analyzována jedna samice *N. gabriellae* s antikoncepcí, kdy metabolity progesteronu vykazovaly uniformní hodnoty pravděpodobně jako výsledek působení preparátu a následně také jeden dospělý samec *N. leucogenys* s aplikovanou antikoncepcí, kdy metabolity estrogenu vykazovali enormně vysoké hodnoty. Přes ojedinělý nález ve všech třech případech je potřeba zdůraznit, že se jedná o zcela první záznam takovýchto informací.

V rámci celé studie byly analyzovány vzorky od juvenilních a subadultních jedinců obojího pohlaví včetně dospělých samců v porovnání k dospělým samicím. I přes nerovnoměrnost zastoupení množství jedinců v některých věkových kategoriích, naznačují výsledky rozdílnost v koncentracích hormonů mezi jednotlivými kategoriemi. Kombinace stanovení progesteronu a estrogenu umožňuje jednoznačně rozeznat jednotlivé pohlaví mezi subadulty, kdy u samic je diagnostikován nástup ovariálního cyklu okolo 4, 5 – 5 let.

Jak uvádí Wasserman et al. (2013), mezi faktory ovlivňující koncentrace hormonů patří např. vliv prostředí, potravy, pohlaví a věk zvířete, tak také intra a inter sociální faktory, jako je hierarchie a velikost skupiny. Proto byly výsledky hormonálních analýz porovnány s vnitřními faktory ve skupině a to, zda vzorkovaný jedinec byl chován v rodině s mláďaty nebo pouze

v páru bez mlád'at, anebo jen s jedním z rodičů. Složení skupiny navíc může ovlivňovat i dobu nástupu pohlavní dospělosti (Ziegler et al., 2009; Zhou et al., 2008), přestože je známa i možná flexibilita (Emlen, 1995).

Statisticky významné rozdíly se potvrdily při porovnání výsledků progesteronu a estrogeneru mezi rodinami s mlád'aty a chovným párem bez mlád'at, podobně také i mezi jedním rodičem s mlád'aty a párem bez mlád'at. Výsledky mohou být ovlivněny individualitou každého člena ve skupině a jeho věkem, kdy v případě párů převažovaly nově sestavené mladé chovné páry, a především zvýšené hodnoty estrogeneru odpovídají plnému rozvoji pohlavní dospělosti (Dixson, 2012). Na druhé straně věk potomků ve skupině může také přispívat k variabilitě hladin hormonů, jak již bylo naznačeno v souvislosti s březostí samice a narozením nového mláděte (Burns et Dooley, 2011). Adolescentní jedinci se v chovech zapojují velmi brzy do péče o novorozené mládě, někdy jako strategie proti odvrácení agrese ze strany rodičů (Burns et Dooley, 2011), proto i u těchto jedinců můžeme předpokládat variabilitu ve fyziologických hodnotách ovlivněnou jejich sociálním postavením ve skupině.

Charakteristickým znakem rodu *Nomascus* je kromě výrazného pohlavního dimorfismu, který je detekovatelný až po nástupu tělesné dospělosti (Mootnick et Fan, 2011), také změna barvy srsti u adolescentních samic z černé na béžovou. Tato změna je spojována s nástupem ovariálního cyklu, tj. sexuální dospělosti (Delacour, 1951), ale existuje i záznam o nástupu ovariálního cyklu před změnou barvy (Geissmann, 1981; Leclerc-Cassan, 1981). V naší studii jsme analyzovali 4 z 5 subadulních samic (*N. leucogenys* a *N. gabriellae*). Nástup ovariálního cyklu byl u těchto samic zaznamenán okolo 4,5 – 5,5 let, což potvrzuje i Rawson et al. (2011). Pravidelnému cyklu u mladých samic předchází období tzv. adolescentní infertility charakterizované nepravidelným cyklem a během puberty dochází k nárůstu estradiolu, který ovlivňuje vznik sekundárních pohlavních znaků (Dixson, 2012). Tento fakt můžeme potvrdit i z našich výsledků v případě koncentrace metabolitů progesteronu, ale ne zcela u estrogeneru. Z řady studií víme, že u gibonů v lidské péči dochází k nástupu pohlavní dospělosti dříve oproti zvířatům ve volné přírodě. (Geissmann, 1981; Leighton, 1987; Barlet, 2008, Rafacz, 2010). Nicméně, jedna studie u *N. hainanus* z volné přírody uvádí odchod potomka od rodiny již ve věku 5,5 let (Zhou et al., 2008).

Předpokladem pro rychlejší dospívání v chovech v lidské péči může být i energeticky bohatá potrava umožňující rychlejší tělesný růst jedince (Melfi et Marples, 2000).

Na základě poznatků Wassermann et al. (2013) byly tyto 4 samice vyhodnoceny nejen z hlediska hladin hormonů, složení chovné skupiny a chovatelských podmínek, ale i vzhledem k barvě srsti během doby odběru vzorků. Výsledky ukazují, že nástup ovariačního cyklu nekoreluje se změnou barvy srsti, ale naznačují souvislost vlivu sociálních podmínek, což přispívá k závěrům studie Burns et Judge (2016) o změně chování rodičů vůči potomkům v období nástupu puberty a změny barvy srsti u samice po odsunu z rodné skupiny. Dvě samice po dobu vzorkování měli černou barvu srsti až do doby přesunu do jiné zoologické zahrady (5,5 a 6,7 let). Naopak jedna ze samic (Beaunt, ZOO Ústí n. L.) začala měnit barvu srsti až po přesunu k novému samci, ale byla i nadále chována v blízkosti své matky. Zde je možná souvislost s poznatkem Burns et Judge (2016) o zvýšené agresivitě matky vůči dceři okolo jejího pátého roku života (*N. leucogenys*), což vysvětlují jako možný způsob inhibice nástupu reprodukční aktivity této mladé samice. Lze tedy předpokládat určitou souvislost mezi barvoměnou a snahou o snížení případné kompetice ve skupině (Burns et Dooley, 2011), což lze přiblížit i výše popsané situaci blízkosti matky. Poslední ze 4 monitorovaných samic (*N. gabriellae*) přebarvila během odběru vzorků velmi rychle (do 5,5 let), kde se předpokládá souvislost s nepřítomností matky, která uhynula a samice byla chována po určitou dobu jen s otcem.

Podobný proces byl sledován i v Zoo Mulhouse u gibona siki (*N. siki*). V této skupině po ztrátě dospělé samice se její nejstarší dcera přebarvila během půl roku (Lefaux, osobní sdělení).

Odlíšným případem byl transport mladé samice ze ZOO Olomouc do ZOO Fuengirola k domnělému samci. Po spojení obou zvířat ovšem došlo ve velmi krátké době (cca 1 měsíc) k přebarvení místního „samce“ (Recuero, osobní sdělení). Obdobný případ rychlého přebarvení samice (samice Faranga, ZOO Ústí n. L.) po přemístění udává i ZOO Lyon (Douay, osobní sdělení). Všechny tyto příklady předkládají možnou otázku souvislosti změny barvy u subadultních samic a dominantního vlivu matky a vliv změny prostředí po vytvoření vlastního teritoria.

Z dosavadních výsledků zatím nelze učinit jednoznačný závěr, co je spouštěcím faktorem pro přebarvení samice. Výsledky naznačující mnohem hlubší, pravděpodobně multifaktoriální souvislosti, pro jejichž vysvětlení by bylo nutné vyhodnotit mnohem širší řadu samic ve věku od 4 do 7 let. Z hlediska fyziologie by bylo vhodné stanovit např. metabolity kortizolu a tyroidních hormonů, vzhledem k funkci hypofýzy v neurologické kontrole fyziologie reprodukce, především na úrovni epifýzy inhibující sekreci gonadotropin uvolňujícího hormonu, ale i sekreci gonád (Aleandri et al., 1996). Z hlediska sociálních faktorů je třeba

zohlednit složení chovné skupiny, prostor ubikace, možný vliv jiných skupin gibbonů či primátů popř. druhu.

Otázkou zůstává i nevyjasněný efekt estrogenů na tvorbu melanocytů ovlivňujících pigment srsti, vliv estradiolu na aktivitu hormonu tyrozinázy v souvislosti s typem a vlivem prostředí, pohlaví a věku jedince (Thornton, 2002).

V souvislosti s estrogény je potřeba také zmínit případný vliv fytoestrogenů z potravy. V této studii byla zvířata krmena granulemi obsahujícími jak sóju (*Glycine max*), tak vojtěšku (*Medicago sativa*). Pouze ve dvou zoologických zahradách (ZOO Chleby a ZOO Hannover) nekrmili granulemi, ale nabízeli v krmné dávce gibbonům luštěniny (*Fabacea*) nebo obiloviny (*Poaceae*), přesto u nich nebyl zaznamenán rozdíl v hladinách hormonů oproti zoologickým zahradám podávajícím primátům granule. Fytoestrogenní účinek na reprodukci je známý (Monfort et al., 1984) a popsán i u primátů (Stroud et al., 2006; Higham et al., 2007; Thompson et al., 2008; Lu et al., 2010; Wasserman et al., 2012; Wasserman et al., 2013). Můžeme tedy předpokládat i určitý vliv v případě analyzovaných zvířat v této studii. Vzhledem k tomu, že se předpokládá schopnost produkce metabolitů fytoestrogenů v závislosti na složení střevní mikroflóry (Hutchins et al., 1995; Kelly et al., 1995; Lundh, 1995; Ueno et al., 2002; Patissaunt et al., 2009) včetně vlivu jedince (Cassidy et al., 2006) a i vzhledem k tomu, že neexistují informace o složení střevní mikroflóry u gibbonů rodu *Nomascus*, nelze případný vliv fytoestrogenů objektivně vyhodnotit. Pro budoucí výzkum by bylo vhodné zahrnout tyto poznatky do hlubšího kontextu v souvislosti s problematikou nevyváženého poměru pohlaví v chovech v zoologických zahradách (Lefaux, 2013) a propojit s poznatky o vlivu estrogenů během perinatálního života na modulaci genů (Kaludjerovic et Ward, 2012).

6 Závěry a doporučení

Z praktického využití potvrdily využití neinvazivních metod, jak pro určení pohlaví u gibbonů rodu *Nomascus*, tak využití pro monitoring reprodukčního cyklu i případných faktorů ovlivňujících reprodukci a chování zvířat.

6.1 Doporučení pro management chovu gibbonů rodu *Nomascus*

- metoda PCR je využitelná pro neinvazivní určení pohlaví u všech věkových kategorií gibbonů rodu *Nomascus*
- metoda EIA je využitelná pro neinvazivní monitoring reprodukčního cyklu gibbonů rodu *Nomascus*
- analýzy metabolitů progesteronu a estrogeneru umožňují vyhodnotit reprodukční a sociální stav nejen u samic, ale i samců a subadultních potomků
- při vyhodnocování reprodukčních parametrů je potřeba brát v souvislost i sociální faktory ve skupině a velikost skupiny, což se odráží i na velikosti a vybavení chovatelského zařízení
- nástup pohlavního cyklu u mladé samice může být ovlivněn přítomností matky chované v její blízkosti

7 Grantová podpora

Studie byla podpořena Interní grantovou agenturou Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, IGA VFU 33/2011/ FVL.

8 Seznam použité literatury – References

Aleandri, V., Spina, V., Morini, A. 1996. The pineal gland and reproduction. Human Reproduction Update. Vol. 2. No. 3. 225 - 235.

Arai, Y., Uehara, M., Sato, Y., Kimin, M., Etoshida, A., Adlercreutz, H., Watanabe, S. 2000. Comparison of isoflavones among dietary intake, plasma concentration and urinary excretion for accurate estimation of phytoestrogen intake. Journal of Epidemiology 10. 127 - 135.

Aramaki, Y., Hideaki O., Mouri, Y., Takizawa, K., Nakanishi, K., Hyoudou, Y., Omasa, M., Kusunoki, H. 2010. Urinary estrogens, progesterone, and LH changes during normal menstrual cycles of a captive female pileated gibbon (*Hylobates pileatus*). Journal of Medical Primatology. 381- 384.

Atsalis, S., Margulius, S. W., Bellem, A., Wielebnowski, N. 2004. Sexual Behavior and Hormonal Estrus Cycles in Captive Aged Lowland Gorillas (*Gorilla gorilla*). American Journal of Primatology 62. 123 - 132.

Bachmann, J., Sodano, C. 2001. Birth management of a pair of white-cheeked gibbons at Brookfield Zoo. The Apes: Challenges for the 21st century. Brookfield Zoo. Illinois, U.S.A. Conference Proceedings. p. 96 - 98.

Bahr, N. I., Palme, R., Möhle, U., Hodges, J. K., Heistermann, M. 2000. Comparative aspects of the metabolism and excretion of cortisol in three individual nonhuman primates. General and Comparative Endocrinology 117. 427 - 438.

Barelli, C., Heistermann, M., Boesch, C., Reichard, U. H. 2007. Sexual swellings in wild white-handed gibbon females (*Hylobates lar*) indicate the probability of ovulation. Hormones and Behaviour 51.221 - 230.

Barelli, C., Heistermann, M., Boesch, Ch., Reichard, U. H. 2008. Mating patterns and sexual swellings in pair-living and multimale groups of wild white-handed gibbons, *Hylobates lar*. *Animal Behaviour*. 991 - 1001.

Barelli, C., Heistermann, M. 2009. Monitoring Female Reproductive Status in White-Handed Gibbons (*Hylobates lar*) Using Fecal Hormone Analysis and Patterns of Genital Skin Swellings. In: Lappan, S., aWhittaker, D. J. (eds.). *The Gibbons, New Perspective on Small Ape Socioecology and Population Biology*. Chapter 15. p. 313 - 325.

Barlett, T. Q. 2007. The Hylobatidae: small apes of Asia. In: Campbell, C., Fuentes, A., MacKinnon, K. C., Panger, N., Bearder, S. K. (eds.) *Primates in Perspective*. Oxford University Press. New York. p. 274 - 289.

Bleisch, B., Geissmann, T., Manh Ha, N., Rawson, B., Timmins, R. J. 2008. *Nomascus leucogenys*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T39895A10272040.<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T39895A10272040.en>. Downloaded on 30 March 2016.

Box, H. O. 1984. *Behaviour and Social Ecology*. J. W. Arrowsmith Ltd. Bristol. United Kingdom. pp. 282. ISBN-13: 978-94-010-8943-2.

Bradley, B. J., Chambers, K. E., Vigilant, L. 2001. Accurate DNA-based sex identification of apes using non-invasive samples. *Conservation Genetic* 2.179 - 181.

Brockleman, W.Y., Richard, U., Treesucon, U., Raemaekers, J. J. 1998. Dispersal pair information and social structure in gibbons (*Hylobates lar*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 42. 329 - 339.

Brown, J. L. 2006. Comparative endocrinology of domestic and nondomestic *Felis*. *Theriogenology* 66. 25 - 36.

Burns, B. L., Dooley, H. M. 2011. Social dynamics modify behavioural development in captive white-cheeked (*Nomascus leucogenys*) and silvery (*Hylobates moloch*) gibbons. *Primates* 52. 271 - 277.

Burns, B. L., Judge, D. S. 2016. The Varied Path to Adulthood: Plasticity in Developmental Timing in Hylobatids. *American Journal of Primatology* 78. 610 - 625.

Cadamuro, V. C., Bouakaze, C., Croze, M., Schiavinato, S., Tonasso, L., Gerard, P., Fausser, J. L., Gibert, M., Dugoujon, J. M., Braga, J., Balaesque, P. 2015. Determined about sex: Sex-testing in 45 primate species using a 2Y/1X sex-typing assay. *Forensic Science and International Genetic* 14. 96 - 107.

Caine, N. G. 1986. Behavior during puberty and adolescence. In: Mitchell, G., Erwin, J.(eds.).*Comparative Primate Biology. Volume 2. Part A: Behavior, Conservation and Ecology.* New York.: Alan, R. Liss Incorporation. p. 327 - 361.

Cameron, J. L. 1997. Stress and behaviorally induced reproductive dysfunction in primates. *Seminar Reproduction Endocrinology* 15. 37 - 45.

Campbell, C. J., Shideler, S. E, Todd, H. E., Lasley, B. I. 2001. Fecal Analysis of Ovarian Cycles in Female Black – Handed Spider Monkey (*Ateles geoffroyi*). *American Journal of Primatology* 54. 79 - 89.

Cassidy, A., Brown, J. E., Hawdon, A., Faughnan, M. S., King, J. S., Millward, J., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B., Setchele, K. D. 2006. Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans after ingestion of physiologically relevant levels from different soy foods. *Journal of Nutrition* 136. 398 - 406.

Clark, E., Picciano, M. F., Baumrucker, C. R. 1992. Hormones and Growth Factors in Milk. *Endocrine Reviews.* Vol. 14. No. 6. 710 - 728.

Cocks, L. 2000. Husbandry Manual for the Javan Gibbon (*Hylobates moloch*). Perth Zoo. pp. 24.

Cornwell, T., Cohick, W., Raskin, I. 2004. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry* 65. 995 - 1016.

Crowther J. R. 2009. Systems in ELISA. In: The ELISA guidebook, second edition. Walker, J. M. (ed.). Human Press Incorporation. Totawa, New Jersey. p. 1 – 71.

Csapo, A. I., Pulkkinen, M. 1978. Indispensability of the human corpus luetum in the maintenance of early pregnancy. Luteectomy evidence. *Obstetrical & Gynecology Survey* 33. 69 - 81.

D'Alessando, T. L., Boersma Maland, B. J., Peterson, T. G., Sfakianos, J., Prasain, J. K., Patel, R. P., Darley-Usman, V. M., Botting, N. P., Barnes, S. 2005. Metabolism of Phytoestrogen Conjugates. *Methods of Enzymology*. Vol. 400. 316 - 342.

Dahl, J. F. 2015. A Comparative Study of the external genitalia of female Hylobatids: Adolescent *Nomascus* masquerade as males. *American Journal of Physical Anthropology* 156. 115 - 115.

Delacour, J. 1951. Les gibbons. *Science et Nature*. 2 - 12.

Denhard, M. 2011. Non-invasive Monitoring of Hormones. Basic endocrinology. Summer school „Non-invasive Monitoring of Hormones“. IZW Berlin.

Denhard M., Schreer A., Krone O., Jewgenow K., Krause M., Grossmann R. 2003. Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*), and the goshawk (*Accipiter gentilis*). *General and Comparative Endocrinology* 131. 345 - 352.

Deputte, B. L., Leclerc-Cassan, M. 1981. Sex determination and age estimation in the White-cheeked gibbon. *Hylobates concolor leucogenys* anatomical and behavioral features. *International ZOO Yearbook*. Volume 21. Issue 1. 187 - 193.

Di Fiore, A. 2005. A rapid genetic method for sex assignment in non-human primates. *Conservation Genetetic* 6.1053 - 1058.

Dixson, A. F. 2012. Primate Sexuality: Comparative Studies of the Prosimians, Monkeys, Apes, and Humans. Oxford University Press. Oxford. p. 28 - 35.

Einspanier, A., Gore, M. A. 2005. Reproduction: definition of Primate Model of Female Fertility. In: Wolfe-Coote, S., Petrusz, P., Bullock, G. (eds.) Elsevier Academic Press. San Diego. California, U.S.A.: The Laboratory Primate. Chapter 7. 105 - 108.

Emlen, S. T. 1995. An evolutionary theory of the family. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92. 8092 - 8099.

Engelhardt, A., Hodges, J. K., Niemitz, C., Heistermann, M. 2000. Female sexual behavior, but not sex skin swelling, reliably indicates the timing of the fertile phase in wild long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*). Hormones and Behavior 47. 195 - 204.

Fagen, R. 1993. Primate juveniles and primate play. In: Pereira, M. E., Fairbanks, L. A., (eds.). Juvenile primates: life history, development, and behavior. Chicago. University of Chicago Press. p. 183 - 196.

Fan, F. 201. The past, present, and future of gibbons in China. Biological Conservation. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2016.02.024>>.

Fan, P. F., Jiang, L. X. 2010. Maintenance of Multifemale Social Organization in a Group of *Nomascus concolor* at Wuliang Mountain, Yunnan, China. International Journal of Primatology 31. 1 - 13.

Fan, P. F., Bartlett, T. Q., Fei, H. L., Ma, Ch. Y., Zhang, W. 2015. Understanding stable bi-female grouping in gibbons: feeding competition and reproductive success. Frontiers in Zoology 12. p. 5.

Fickel, J. 2011. Non-invasive DNA analysis using fecal samples for identification of species, sex, and individuals. Summer school „Non-invasive Monitoring of Hormones“. IZW Berlin.

Fischer, W. 1980. Einige Ergänzungen zur Haltung und Entwicklung des Schopfgibbons, *Hylobates (Nomascus) concolor* (Harlan). Milu, Berlin 5(1/2). p. 167 - 193.

- Fortman, J. D., Herring, J. M., Miller, J. B., Hess, D. L., Verhage, H. C., Fazleabas, A. T. 1993. Chorionic Gonadotropin, Estradiol, and Progesterone Levels in Baboons (*Papio anubis*) during Early Pregnancy and Spontaneous Abortion. *Biology of Reproduction* 49. 737 - 742.
- Fuentes, A. 1999. Re-evaluating primate monogamy. *American Anthropologist* 100. 890 - 907.
- Fuentes, A. 2000. Hylobatid communities: Changing views on pair bonding and social organization in hominoids. *Yearbook of Physical Anthropology* 43. 33 -60.
- Fujita S., Mitsunaga, F., Sugiura, H., and Shimizu, K. 2001. Measurement of Urinary and Fecal Steroid Metabolites During the Ovarian Cycle in Captive and Wild Japanese Macaques, *Macaca fuscata*. *American Journal of Primatology* 53. 167 - 176.
- Fuller, G., Margulius, S. W., Santymire, R. 2010. The Effectiveness of Indigestible Markers for Identifying Individual Animal Feces and Their Prevalence of Use in North American Zoos. *Zoo Biology* 29. 1 - 20.
- Fürtbauer, I., Schülke O., Heistermann, M., Oster, J. 2010. Reproductive and Life History Parameters of Wild Female *Macaca assamensis*. *International Journal of Primatology* 31. 501 - 517.
- Geissman, T. 1991. A Reassessment of Age of Sexual maturity in Gibbons (*Hylobates spp.*). *American Journal of Primatology* 23. 11 - 22.
- Geissmann, T. 1995. Captive management and conservation of gibbons in China and Vietnam, with special reference to crested gibbons (*Hylobates concolor* group). *Primate Report* 42. 29 - 41.
- Geissmann, T. 2000. *Gibbon Systematics and Species Identification* [online] 2013 [cit. -2013-06-30]. Available from:< <http://www.gibbons.de/main/index.html>>.

Geissmann, T., and Anzenberger, G. 2009. Hormonal correlates of the ovarian cycle in the yellow-cheeked gibbon (*Nomascus gabriellae*), and a review of ovarian cycles in gibbons (*Hylobatidae*). *Gibbon Journal* Nr.5. 61 - 70.

Geissmann T, Lim K. K. P. 1994. Extraction of bacula from tanned gibbon skins. *Raffles Bulletin of Zoology* 42. 775 - 780.

Geissmann, T., Manh Ha, N., Rawson, B., Timmins, R., Traeholt, C., Walston, J. 2008. *Nomascus gabriellae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T39776A10265736.<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T39776A10265736.en>.
Downloaded on 30 March 2016.

Gesquire, L. R., Altman, J., Khan, M. Z., Couret, J., Yu, J. C., Endres, C. S, Lynx, J. W., Ogola, P., Fox, E. A., Alberts, S. C., Wango, E. O. 2005. Coming of age: steroid hormones of wild immature baboons (*Papio cynocephalus*). *American Journal of Primatology* 67. 83 - 100.

Gesquiere, L. R., Wango, E O., Alberts, S. C., Altman, J. 2007. Mechanism of sexual selection: sexual swellings and estrogen concentrations as fertility indicators and cues for male consort decisions in wild baboons. *Hormones and Behaviour* 51. 114 - 125.

Goymann, W. 2005. Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings – Physiological validation, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. *Annals of the New York Academy Sciences* 1046. 35 - 53.

Goymann, W. 2012. On the use of non-invasive hormone research in uncontrolled, natural environments: the problem with sex, diet, metabolite rate and the individual. *Methods in Ecology and Evolution* 3. 757 - 765.

Graham, L., Schwarzenberger, F., Möstl, E., Ggalama, W., Savage, A. 2001. A Versatile Enzyme Immunoassay for the Determination of Progestogens in Feces and Serum. *ZOO Biology* 20. 227 - 236.

Hall, P. F. 1987. Cytochromes P450 and the regulation of steroid synthesis. In: Hu, J., Zhang, Z., Shen, W. J., Azhar, S. (eds.). Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition & Metabolism* 7. 47 - 1.

Harville, E. W., Wilcox, A. J., Baird, D. D., Weinberg, C. R. 2003. Vaginal bleeding in very early pregnancy. *Human Reproduction*. Vol. 18. No 9. 1944 - 1947.

Hasan, R., Baird, D. D., Herring, A. H., Olsham, A. F., Jonsson Funk, M. L., Hartmann, K. E. 2010. Patterns and predictors of vaginal bleeding in the first trimester of pregnancy. *American Epidemiology* 20. 524 - 531.

Heistermann, M. 2010. Non – invasive monitoring of endocrine status in laboratory primates: methods, guidelines and applications. *Advances in Science & Research* 5. 1 - 9.

Heistermann, M. 2011. Non-invasive endocrine assessment. Principle of enzyme-immunoassay and analytical validation. Summer school „Non-invasive Monitoring of Hormones“. IZW Berlin.

Heistermann, M., Tari, S., Hodges, J. K. 1993. Measurements of faecal steroids for monitoring ovarian function in New World primates, Callitrichidae. *Journal of Reproduction and Fertility* 99. 243 - 251.

Heistermann, M., Möhl, U., Vervaecke, H., van Elsacker, L., Hodges, J. K. 1986. Application of urinary and fecal steroid measurements for monitoring ovarian function and pregnancy in the bonobo (*Pan paniscus*) and evaluation of perineal swelling in relation to endocrine events. *Biology Reproduction* 55. 844 - 853.

Heistermann, M., Uhrigshardt, J., Husung, A., Kaumanns, W., Hodges, J. K. 2001. Measurement of Faecal Steroid Metabolites in the Lion-Tailed Macaque (*Macaca silenus*): A Non-invasive Tool for Assessing Female Ovarian Function. *Primate Report* 59. 27 - 38.

Hewlett, B. L., Hewlett, B. S. 2013. Hunter-gatherer adolescence. Adolescent identity: evolutionary, cultural and developmental perspectives. New York. Routledge. p. 73 - 101.

Higham, J., Ross, C., Warren, Y., Heistermann, M., Mac Laenon, A. 2007. Reduced reproductive function in wild baboons (*Papio hamadryas anubis*) related to natural consumption of the African black plum (*Vitex dorniana*). *Hormones and Behavior* 52. 384 - 390.

Hodges, J. K., Heisterman, M. 2011. Field endocrinology: monitoring hormonal changes in free-ranging primates. *Field and Laboratory Methods in Primatology: A Practical Guide*. Cambridge University Press. p. 353 - 367.

Hodgkiss, S., Thetford, E., Waite, C. D., Nijman, V. 2010. Female Reproductive Parameters in the Javan Gibbon (*Hylobates moloch*). *Zoo Biology* 29. 449 - 456.

Hradec, M., Bolechová, P., Svobodová, I. 2016. Production of female-specific great call in an immature male gibbon, the *Nomascus* genus. *Primates*. (Article in press). DOI:10.1007/s10329-016-0569-4.

Huang, B., Guan, Z., Ni, Q., Orkin, J. D., Fan, P., Jiang, X. 2013. Observation of intra-group and extra-group copulation and reproductive characters in free ranging groups of western black crested gibbon (*Nomascus concolor jingdongensis*). *Integrative Zoology* 8. 427 - 440.

Hubert, K. 1998. Amplification technics. In Thomas, L.: *Clinical Laboratory Diagnostics*. First Edition. TH-Books. Frankfurt/Main p. 1449 - 1452.

Hutchins, A. M., Slavin, J. L., Lampa, J. W. 1995. Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. *Journal of the American Dietetic Association* 95. 545 - 551.

Cheyne, S. M., Chivers, D. J. 2006. Sexual swellings of female gibbons. *Folia Primatologica* 77. 345 - 352.

Chivers, D. J. 1972. The siamang and the gibbon in the Malay peninsula. In: Rumbangh, D. M. (eds). Vol.1. Karger, Basel. p. 1 - 335.

Chivers, D. J. 1976. Communication within and between family group of siamang (*Symphalangus syndactylus*). Behaviour 57. 116 - 135.

Jauniaux, E., Johus, J., Burton, G. J. 2005. The role of ultrasound paging in diagnosing and investigating early pregnancy failure. Ultrasound in Obstetrics & Gynecology 25. 613 - 624.

Jiang, X. L., Ma, S. L., Wang, Y. ., Sheeran, L. K., Poirier, F. E., Wang, Q. 1994. Group size and composition of black-crested gibbons (*Hylobates concolor*). Zoological Research 15. 15 - 22.

Jiang, H. S., Song, X., Zhang, J., Wang, C., Wang, C., Chen, K. 1999a. The population dynamic of *Hylobates concolor hainanus* in Bawangling National Nature Reserve in Hainan Island. Unpublished report.

Jiang, X. L., Wang, Y. X., Wang, Q. 1999b. Coexistence of monogamy and polygyny in black-crested gibbon (*Hylobates concolor*). Primates 40. 607 - 611.

Jurke, M. H., Hagey, L. R., and Czekala, N. M. 2000. Monitoring Hormones in Urine nad Feces of Captive Bonobos (*Pan paniscus*). Primates 41. 311 - 319.

Kaludjerovic, J., Ward, W. E. 2012. The Interplay between Estrogen and Fetal Adrenal Cortex. Journal of Nutrition and Metabolism 1. p. 12.

Kelly, G. E., Joannon, G. E., Reeder, A. Y., Nelson, C., Waring, M. A. 1995. The variable metabolit response to dietary isoflavones in humans. Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine 208. 40 - 42.

Kenyon, M. 2007. The ecology of the golden-cheeked gibbon (*Nomascus gabriellae*) in Cat Tien National Park, Vietnam. PhD thesis. Anatomy School. University of Cambridge. Cambridge.<<https://www.repository.cam.ac.uk/handle/1810/252077>>.

Kenyon, M, Roos C, Binh V., T, Chivers, D. 2011. Extra pair paternity in golden-cheeked gibbons (*Nomascus gabriellae*) in the secondary lowland forest of Cat Tien National Park, Vietnam. *Folia Primatologica* 82. 154 - 64.

Kleiman, D. F. 1977. Monogamy in mammals. *Quarterly Review of Biology* 52. 39 - 69.

Lambell, J. D. 1986. Cytochrome P-450_{scc}: a review of the specificity and properties of the cholesterol bindy sites. In: Hu, J., Zhang, Z., Shen, W. J., Azhar, S. (eds.). Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid homones. *Nutrition & Metabolism* 7. 47 - 1.

Lasley, B. L., Savage, A. 2007. Advances in the understanding of primate reproductive endocrinology. In: Campbell, C., Fuentes A., K. C. M., Panger, M., Bearder, S. (eds). *Primates in perspective*. New York. Oxford University Press. p. 356 - 369.

Lefaux, B. 2013. European Studbook Number 8. December 2012. Parc Zoologique et Botanique. Mulhouse. France. p. 1 - 78.

Lefaux, B. 2014. European Studbook Number 9. December 2013. Parc Zoologique et Botanique. Mulhouse. France. 1 - 50.

Leighton, S. S. R. 1987. Gibbons: territoriality and monogamy. In: Smuts, B. B., Cheyney, D. L., Seyfarth, R. M., Wrangahm, R. W., Struhsaker, T. T. (eds). *Primate Societies*. University of Chicago Press. Chicago. p. 135 - 145.

Lernould, J. M. 1993. International studbook: *Hylobates concolor* (Harlan, 1826) 1990, 1st edition. Parc Zoologique et Botanique. Mulhouse pp. 127.

Lodish, H. , Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. 2000. Molecular Cell Biology 4.0. Media Connected. W.H.Freeman and Company. New York. p. 246 - 248.

Lu, A., Beehner, J., Czekala, N., Koenig, A., Larney, E., Borries, C. 2010. Phytochemicals and reproductive function in wild female Phayre's leaf monkeys (*Trachypithecus phayrei crepusculus*). Hormones and Behavior 59. 28 - 36.

Lukas, K. E., Barkauskas, R. T., Maher, S. A., Jacobs, B. A., Bauman, J. E., Anderson, A. J., Calcagno, J. M. 2002. Longitudinal study of delayed reproductive succes in a pair of white-cheeked gibbon (*Hylobates leucogenys*). ZOO Biology 21. 413 - 434.

Lundh, T. 1995. Metabolism of estrogenic isoflavomes in domestic animals. Proceeding of the Society Experimental Biology and Medicine 208. 33 - 39.

Lynch, J. W., Khan, M. Z., Altman, J., Njahira, M .N., Rubenstein, N. 2003. Concentrations of four fecal steroids in wild baboons: short-term storage conditions and consequences for data interpretation. General and Comparative Endocrinology 132. 264 - 271.

Maheshwari, H., Sjahfirdi, L., Astuti, P., Purwantara, B., Alikodra, H. S., Sajuthi, D., Widjajakusuma, R. 2010. Fecal Steroid Profile of Female Javan Gibbons (*Hylobates moloch*) Maintained in Pairing-Typed Cage. HAYATI Journal of Biosciences. Vol. 17. No. 1. 43 - 49.

Maheshwari, H., Sjahfirdi, L., Astuti, P., Purwantara, B., Alikodra, H. S., Sajuthi, D., Widjajakusuma, R. 2012. Fecal Pregnanediol Glucuronide and Serum Progesterone Patterns for Ovarian Function Assessment of Javan Gibbons (*Hylobates moloch*). World Applied Sciences Journal 18 (6). 737 - 744.

Manh Ha, N., Rawson, B., Geissmann, T. & Timmins, R. J. 2008. *Nomascus siki*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T39896A10272362.<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T39896A10272362.en>. Downloaded on 30 March 2016.

Martin, R. D. 2007. The evolution of human reproduction: a primatological perspective. *Yearbook of Physical Anthropology* 50. 59 - 84.

Melfi, Y., Marples, N. 2000. How different captive environments affect the behavior of Sulawesi crested black macaques (*Macaca nigra*). In: Plowman, A. Proceedings of the 2nd Annual Symposium on ZOO research. Federation of Zoological Gardens of Great Britain and Ireland. London p. 151 - 157.

Miller, W. L 1988. Molecular biology of steroid hormone synthesis. In: Hu, J., Zhang, Z., Shen, W. J., Azhar, S. (eds.). Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition & Metabolism* 7. 47 - 2.

Miller, W. L. 2008. Steroidogenic enzymes. In: Hu, J., Zhang, Z., Shen, W. J., Azhar, S. (eds.). Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition & Metabolism* 7. 47 - 1.

Milne, F. H., Judge, D. S. 2001. Brothers delay menarche and the onset of sexual activity in their sister. *Proceedings of the Royal Society. Biological Sciences* 278. 417 - 423.

Miyamoto, S., Chen Y., Kurotori, H., Sankai, T., Yoshida, T., Machida, T. 2001. Monitoring the Reproductive Status of Female Gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) by Measuring the Steroid Hormones in Fecal Samples. *Primates* 42. 291 - 299.

Moisson, P., Prieur, C. 2007. European studbook Number 3: Northern white-cheeked gibbon – *Nomascus leucogenys*, southern white cheeked gibbon – *Nomascus siki*, red cheeked gibbon – *Nomascus gabriellae*. Zoo Mulhouse. Mulhouse, Sud –Alsace. pp. 54.

Monfort, S. L 2003. Non-invasive endocrine measures of reproduction and stress in wild populations. In: Holt, W. V., Pickard, A. R., Rodger, J.C., Wildt, D.E. (eds). Conservation biology: reproductive science and integrated conservation. Cambridge. Cambridge University Press. p. 147 - 165.

Monfort, S. L., Thompson, M. A., Czekala, N. M., Kasman, L. H., Shackleton, Ch., Lasley, B. L. 1984. Identification of non-steroid estrogen, equol, in urine of pregnant macaques: correlation with steroid estrogen excretion. *Journal of Steroid Biochemistry* 20. 869 - 876.

Moorman, E. A., Mendoza, S. P., Shideler, S. E., Lasley, B. L. 2002. Excretion and Measurement of Estradiol and Progesterone Metabolites in the Feces and Urine of Female Squirrel Monkeys (*Saimiri sciureus*). *American Journal of Primatology* 57. 79 - 90.

Mootnick, A. R. 1996. Captive management and the reproduction of the Pileated Gibbon (*Hylobates pileatus*) at the International Center for Gibbon Studies. California. *International Zoo Year Book*. pp. 35.

Mootnick, A. R. 2006. Gibbon (*Hylobatidae*) Species Identification Recommended for Rescue or Breeding Centres. *Primate Conservation* 21. 103 - 138.

Mootnick, A. R., Fan, P. F. 2011. A Comparative Study of Crested Gibbons (*Nomascus*). *American Journal of Primatology* 73. 135 - 154.

Möhle, U., Heistermann, M., Palme, R., Hodges, J. K. 2002. Characterization of urinary and fecal metabolites of testosterone and their measurement for assessing gonadal endocrine function in male nonhuman primates. *General and Comparative Endocrinology* 129. 135 - 145.

Möstl E., Rettenbacher S., Palme R. 2005. Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: An analytical approach. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1046. 17 - 34.

Muir C., Spironello-Vella E., Pisani N., de Catanzaro D. 2001. Enzyme immunoassay of 17beta-estradiol, estrone conjugates, and testosterone in urinary and fecal samples from male and female mice. *Hormone and Metabolic Research* 33. 653 - 658.

Munro C., Stabenfeldt, G. H. 1984. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *Journal of endocrinology* 101. 41 - 49.

Munro C., Stabenfeldt, G. H., Cragun J. R., Addiego L. A., Overstreet J. W., Lasley, B. L. 1991. Relationship of Serum Estradiol and Progesterone Concentrations to the Excretion Profiles of Their Major Urinary Metabolites as Measured by Enzyme Immunoassay and Radioimmunoassay. *Clinical Chemistry* 37/6. 838 - 844.

Norris, D. O. 2007. *Vertebrate Endocrinology*. Elsevier Academic Press. San Diego, U.S.A. p. 72 - 93.

Palme R. 2005. Measuring fecal steroids guidelines for practical application. *New York Academy of Sciences* 1046. 75 - 80.

Palme, R., Rettenbacher, S., Touma, C., El-Bahr, Möhstl, S. H. 2005. Stress hormones in mammals and birds. Comparative aspects regarding metabolism, excretion and noninvasive measurement in fecal samples. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1040. 162 - 171.

Palombit, R. A. 1995. Longitudinal Patterns of Reproduction in Wild Female Simang (*Hylobates syndactylus*) and White-Handed Gibbons (*Hylobates lar*). *International Journal of Primatology*. Vol. 16. No.5. 739 - 760.

Patissant, H., Luskin, J., Wilson, M. 2004. A soy supplement and tamoxifen inhibit sexual behavior in female rats. *Hormones and Behavior* 45. 270 - 277.

Payne A H., Halls, D. B. 2004. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. In: Hu, J., Zhang, Z., Shen, W. J., Azhar, S. (eds.). Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition & Metabolism* 7. 47 - 1.

Pepe, G. J., Albrecht, E. D. 1990. Regulation of the primate fetal adrenal cortex. *Endocrinology Review* 11. 151 - 176.

Pereira, M. E., Altmann, J. 1985. Development of social behavior in free-living non-human primates. In: Watts, E. S. (ed.). *Nonhuman primate models for human growth and development*. Canada. John Wiley & Son. p. 217 - 309.

Petersen, J., Margulis, S., Groome, C. 2010. Population Analysis and Breeding Plan for White-Cheeked Gibbon, *Nomascus leucogenys*, Species Survival Plan®, PMC. Lincoln Park Zoo. Chicago, IL.

Petrusz, P., Bullock, G. 2005. The Laboratory Primates. Elsevier Academia Press. Oxford, U.K. p. 54 - 55.

Phillips, R. S., Wheaton, C. J. 2008. Urinary Steroid Hormone Analysis of Ovarian Cycles and Pregnancy in Mandrills (*Mandrillus sphinx*) Indicate That Menses, Copulatory Behavior, Sexual Swellings and Reproductive Condition Are Associated With Changing Estrone Conjugates (E1C) and Pregnenediol-3-Glucuronide (PdG). *Zoo Biology* 27. 320 - 330.

Pocock, R. I. 1905. Observations upon a female specimen of the Hainan gibbon (*Hylobates hainanus*), now living in the Society's Gardens. *Proceedings of the Zoological Society*. London. p. 169 - 180.

Rabiee A. R., Macmillan K L., Schwarzenberger F. 2002. Plasma, milk and faecal progesterone concentrations during the oestrous cycle of lactating dairy cows with different milk yields. *Animal Reproduction Science* 74. 121 - 131.

Rafacz, M. 2010. Hormonal and Behavioral Patterns of Reproduction and Parental care in the Hylobatidae. PhD Thesis. Chicago. Illions.

Rafacz, M., Margulius, S., Santymere, R. M. 2012. Hormonal Correlates of Paternal Care Differences in Hylobatidae. *American Journal of Primatology* 74. 247 - 260.

Rafacz, M., Margulius, S. V., Santymere, M. 2013. Hormonal and behavioral patterns of reproduction in female hylobatids. *Animal Reproduction Science* 137. 103 - 112.

Ramaswami, L. S. 1986. Primate Biology with Special Emphasis on Reproduction. *Proceedings of the Indian National Science Academy*. B52, No.3. p. 315 - 332.

Rawson, B .M., Insua Cao, P., Nguyen Manh Ha, Van Ngoc Think, Hoony Mink Duc, Mahood, S., Geismann, T., Roos, C. 2011. The Conservation Satus of Gibbons in Vietnam. Fauna & Flora International Vietnam Programme. Hanoi. Vietnam.

Reeder D. M, Kramer, K. M. 2005. Stress in free-ranging mammals: Integrating physiology, ecology, and natural history. *Journal of Mammalian* 86. 225 - 235.

Rode. P. 2009. A propos de la dureé de gestation chez gibbons. In *Mammalia*. Volume 6. Issue 1. p. 46 – 47. ISSN (Online) 1864-1547.

Rubberg, A. T. 1983. The evolution of monogamy in primates. *Journal of Theoretical Biology* 104. 93 - 112.

Saltzman, W., Tardif, S. D., Rutherford, J. N. 2011. Hormones and Reproductive Cycles in Primates. In: Norris, D. O., Lopez, K. H. (eds). Elsevier Academic Press. San Diego. California, U.S.A.: Hormones and reproduction of Vertebrates. Volume 5 – Mammals. Chapter 13.

Sanorn, B. M., Heindel, J. J., Robinson, G. A. 1980. The role of cyclic nucleotides in the reproductive processes. In: Hu, J., Zhang, Z., Shen, W. J., Azhar, S. (eds.). Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid homones. *Nutrition & Metabolism* 7: 47. p. 3.

Schwarzenberger, F. 2007. The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *International Zoological Yearbook* 41. 52 - 74.

Sommer, V., Reichard, U. 2000. Rethinking monogamy: The gibbon case. In: Kappeler, P. M. (eds.). *Primate Males: Causes and Consequences of Variation in Group Composition*. Cambridge, U.K. Cambridge University Press. p. 159 – 168.

Stocco, D. M., Clark, B. J. 1996. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. In: Hu, J., Zhang, Z., Shen, W. J., Azhar, S. (eds.). Cellular cholesterol delivery,

intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition & Metabolism* 7:47 . p. 2.

Stroud, F. C., Appt, S. E., Wilson, M. E., Franke, A. A., Adams, M. R., Kaplan, J. R. 2006. Concentrations of Isoflavones in Macaques Consuming Standard Laboratory Monkey diet. *Journal of American Association for Laboratory Animal Science*. Vol. 45. No. 4. 20 - 23.

Thompson, M. E. 2005. Reproductive Endocrinology of Wild Female Chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthi*): Methodological Considerations and the Role of Hormone in Sex and Conception. *American Journal of Primatology* 67. 137 - 158.

Thompson, E. M. 2009. The endocrinology of intersexual relationships in the apes. In: Ellison P. T., Gray, P. B. (eds.). Cambridge. Harvard University Press. *Endocrinology of Social Relationships*. p. 196 - 224.

Thompson, M. E., Wilson, M., Gotto, G., Muller, M., Pusey, A. 2008. Hyperprogesteronemia in response to *Vitex fischeri* consumption in wild chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*). *American Journal of Primatology* 70. 1064 - 1071.

Thornton, M. J. 2002. The biological actions of estrogens on skin. *Experimental Dermatology* 11. 487 - 502.

Touma, C. Palme, R. 2005. Measuring fecal glucocorticoid metabolism in mammals and birds: the importance of validation. *Annals of the New York Academy Science* 1046. 54 - 74.

Traeholt, C., Bunthoen, R., Rawson, B. M., Samuth, M., Virak, Ch., Vuthim, S. 2005. Status review of pileated gibbon, *Hylobates pileatus* and yellow-cheeked gibbon, *Nomascus gabriellae*, in Cambodia. *Fauna & Flora International Indochina Programme*. Phnan Penh. Cambodia.

Ueno, T., Uchiyama, S., Kikichi, N. 2002. The role of intestinal bacteria on biological effects of soy isoflavones in humans. *Journal of Nutrition* 132. p. 594.

Van Horn, R. N., Eaton, G. R. 1979. Reproductive physiology and behavior in prosimians. In: Doyle G. A., Martin, R. D. (eds.), New York Academic Press: The Study of Prosimian Behavior, p. 79 - 122.

Villesen, P., Fredsted, T. 2006. A new sex identification tool: One primer pair can reliably sex ape and monkey DNA samples. *Conservation Genetic* 7(3). 455 - 459.

Walsh, S. W., Wolf, R. C., Meyer, R. K., Robinson, J. A. 1978. Estrogens in the Uterovarian, Uterine and Peripheral Plasma in Pregnant Rhesus Monkeys. *Biology of Reproduction* 20. 606 - 610.

Wasser, S. K., Hunt, K. E., Brown, J. L., Cooper, K., Crockett C. M., Bechert, U., Millspaugh, J. J., Larson, S., Monfort, S. L. 2000. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *Genetic and Comparative Endocrinology* 120. 260 - 275.

Wasserman, M. D., Taylor-Gutt, A., Rothman, J. H., Chapman, C. A., Milton, K., Leitman, D. 2012. Estrogenic Plants Foods of red Colobus Monkey and Mountain Gorillas in Uganda. *American Journal of Physical Anthropology* 148. 88 - 92.

Wassermann, M. D., Milton, K., Chapman, C. A. 2013. The roles of Phytoestrogens in Primate Ecology and Evolution. *International Journal of Primatology* 34. 861 - 878.

Waterman, M. R., Keeney, D. S. 1996. Signal transduction pathway combining peptide hormone and steroidogenesis. In: Hu, J., Zhang, Z., Shen, W. J., Azhar, S. 2010. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition & Metabolism* 7: 47. 3 - 4.

Zhen, R. 1989. Observations of the menstrual cycles of black gibbon (*H. concolor concolor*). *Zoological Research* 10(2). 154 - 162.

Ziegler, T. E., Savage, A., Scheffer, G., Snowdon, C. T. 1987. The endocrinology of puberty and reproductive functioning in female cotton-top tamarins (*Saguinus Oedipus*) under varying social conditions. *Biology of Reproduction* 37. 618 - 627.

Ziegler, T. E., Wei, F., Li, M., Pui Lock, C. B., Wang, D. 2008. Reproductive characters and mating behavior of wild *Nomascus hainanus*. *International Journal of Primatology* 29. 1037 - 1046.

Ziegler, T. E., Strier, K. B., Van Belle, S. 2009. The reproductive ecology of South American primates: ecological adaptations in ovulation and conception. In: Garber, P.A., Estrada, A., Bicca-Marques, J. C., Heymann, E. W., Strier, K. B. (eds.), New York. Springer: South American Primates: Comparative Perspectives in the Study of Behavior, Ecology, and Conservation p. 191 - 210.

Zhou, J., Wei, F., Li, M., Bosco Lok, Ch., B. P., Wang, D. 2008. Reproductive Characters and Mating Behaviour of Wild *Nomascus hainanus*. *International Journal of Primatology* 29. 1037 - 1046.

9 Přílohy

Příloha č. 1 Informace o analyzovaných jedincích

zoo	druh	jméno	pohlaví	věk (roky)	skupina
Asson	NL	Shanti	F	6,23 - 6,77	P
Bojnice	NG	Lili	F	11,79 - 12,05	FA
Bojnice	NG	Kim	F	2,37 - 2,68	FA
Bojnice	NG	Bonifác	M	14,04 - 14,45	FA
Bojnice	NG	Dien	M	3,79 - 4,21	FA
Bratislava	NG	Linda	F	4,01 - 5,22	PO
Bratislava	NG	Oliver	M	10,13 - 10,64	PO
Eskilstuna	NL	Malou	F	11,02 - 11,71	P
Chleby	NG	Gábina	F	24,19 - 24,82	FA
Chleby	NG	Franěk	M	2,21 - 2,81	FA
Chleby	NG	Kuba	M	24,48 - 24,63	FA
Jihlava	NG	Zlata	F	11,61 - 14,38	FA
Jihlava	NG	Ivana	F	27,24 - 29,98	PO
Liberec	NL	Wen-Wen	F	16,85 - 19,17	FA
Liberec	NL	Shanti	F	4,13 - 5,9	FA
Liberec	NL	Satun	M	2,75 - 3,41	FA
Liberec	NL	Matýsek	M	20,24 - 20,63	FA
Ljubljana	NG	Liling	F	24,30 - 24,71	FA
Lyon	NL	Eli	F	11,94 - 12,41	P
Mulhouse	NS	Fanny	F	18,46 - 18,61	FA
Mulhouse	NL	Connie	F	21,66 - 21,81	FA
Mulhouse	NG	Chloe	F	21,95 - 22,05	FA
Mulhouse	NL	Chukhao	F	4,61 - 4,73	FA
Mulhouse	NS	Anoie	F	6,08 - 6,24	FA
Mulhouse	NS	Dorian	M	21,93 - 22,07	FA
Mulhouse	NG	Dakin	M	3,03 - 3,18	FA
Mulhouse	NS	Chanchki	M	4,03 - 4,16	FA
Mulhouse	NG	Banguin	M	5,20 - 5,35	FA
Olomouc	NG	Miloš	F	19,10 - 19,66	FA
Olomouc	NG	Rony	F	7,60 - 8,13	FA
Olomouc	NG	Silvestr	M	0,14 - 1,05	FA
Olomouc	NG	Baxi	M	0,49 - 1,25	FA
Olomouc	NG	Benjamin	M	2,57 - 3,24	FA
Olomouc	NG	Dan	M	7,27 - 7,87	FA
Olomouc	NG	Hošík	M	9,34 - 9,66	FA
Ostrava	NL	Luesa	F	0,32 - 0,5	FA

zoo	druh	jméno	pohlaví	věk (roky)	skupina
Ostrava	NL	Sulu	F	11,24 - 11,70	FA
Ostrava	NL	Mekong	M	0,62 - 1,74	FA
Ostrava	NL	Rascal	M	16,06 - 16,18	FA
Plzeň	NL	Xian	M	6,82 - 7,84	I
Ústí n. L.	NL	Faranga	F	2,71 - 5,47	PO
Ústí n. L.	NL	Fey	F	24,95 - 28,52	PO
Ústí n. L.	NL	Beaunt	F	4,18 - 7,65	P
Ústí n. L.	NL	Samun	M	7,48 - 10,55	P
Varšava	NG	Bonia	F	19,36 - 19,8	FA
Varšava	NG	Gutek	M	1,94 - 2,41	FA
Varšava	NG	Gucio	M	19,99 - 20,59	FA
Varšava	NG	Mtody	M	4,15 - 4,66	FA

NL = *Nomascus leucogenys*

NG = *Nomascus gabriellae*

NS = *Nomascus siki*

F = samice

M = samec

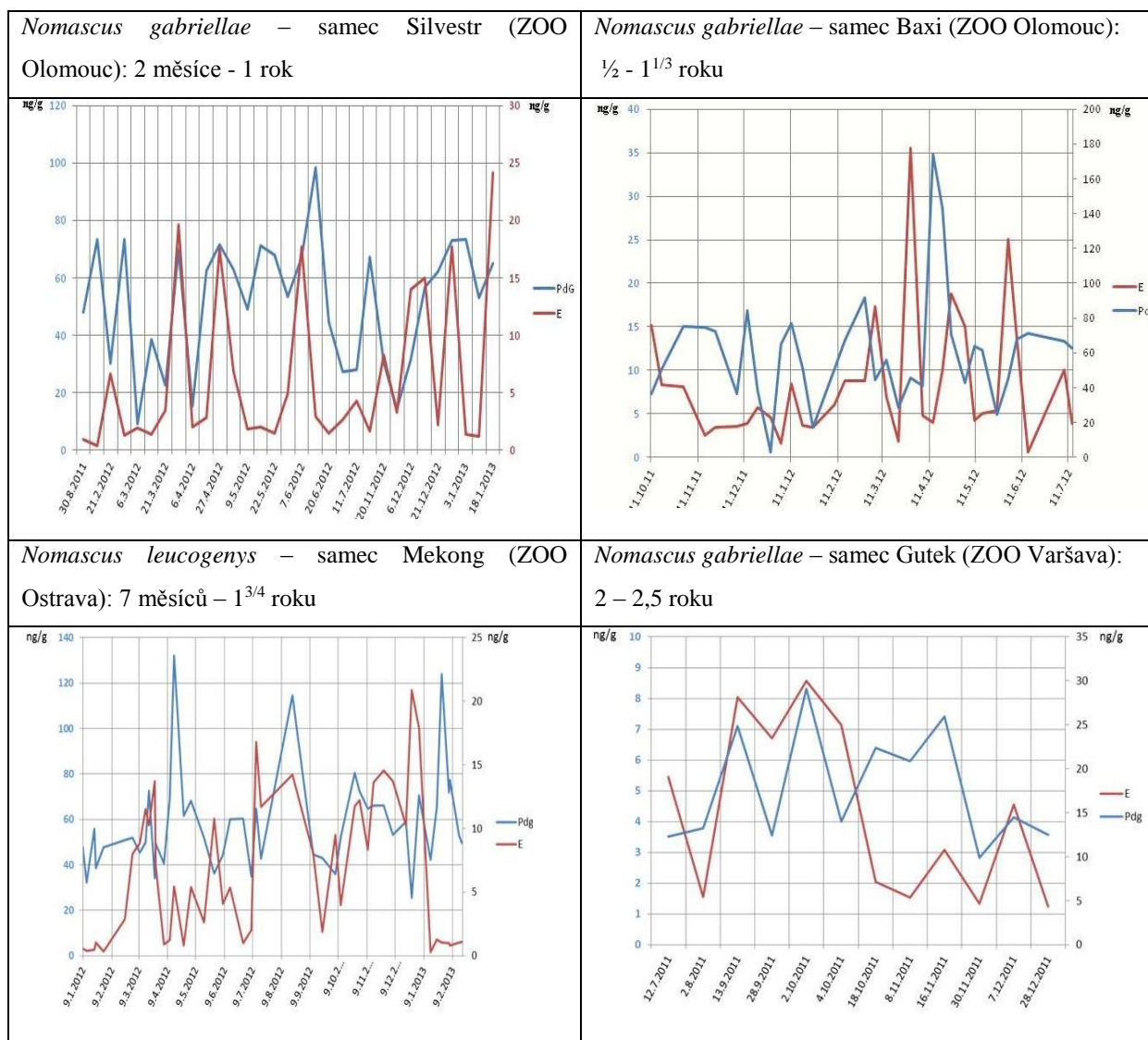
FA = rodina s mládřaty

PO = jeden rodič s mládřaty

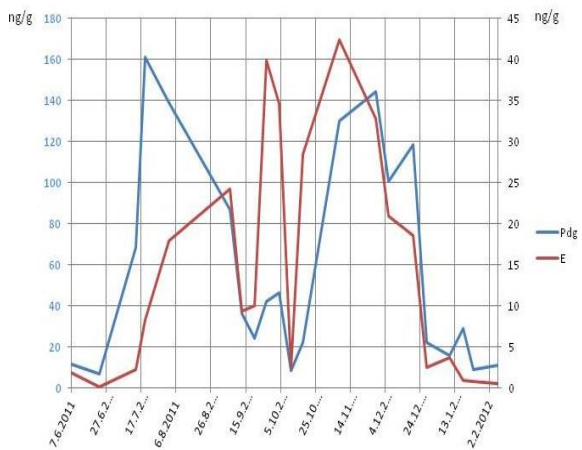
P = chovný pár

I = solitérní jedinec

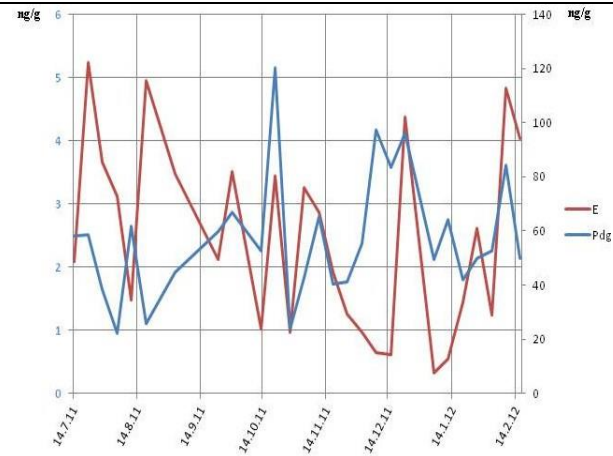
Příloha č. 2 Grafické znázornění koncentrace hormonů progesteronu a estrogeneru (ng/g výkalu) gibbonů rodu *Nomascus* dle jejich věku.



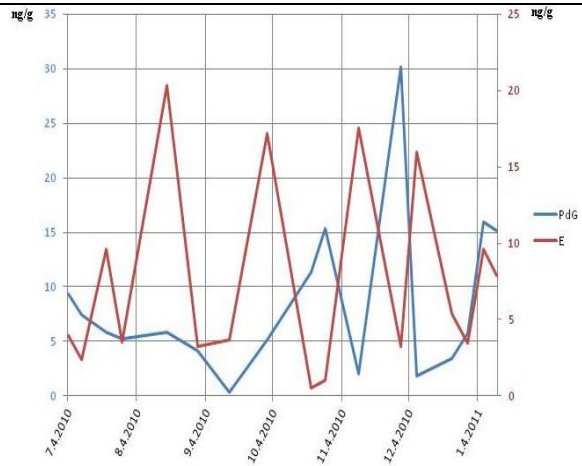
Nomascus gabriellae – samec Benjamin (ZOO Olomouc): 2,5 – 3^{1/3} roku



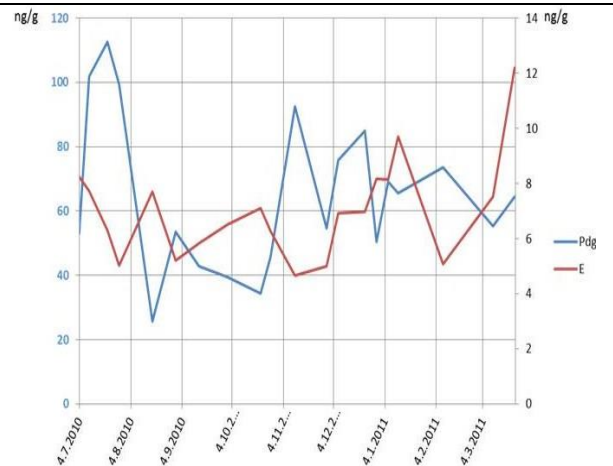
Nomascus gabriellae – samec Franěk (ZOO Chleby): 2^{3/4} - 3 roky



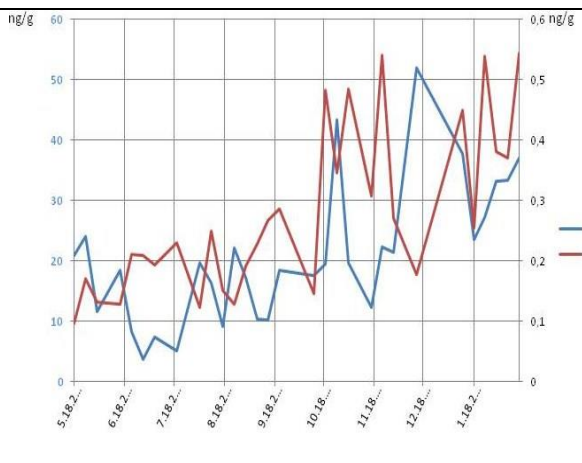
Nomascus gabriellae – samice Kim (ZOO Bojnice): 2^{1/3} – 2^{3/4} roku



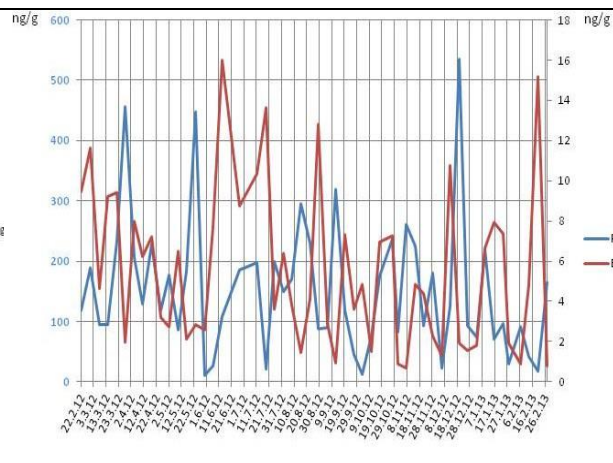
Nomascus leucogenys – samec Satun (ZOO Liberec): 2^{3/4} - 3,5 roku



Nomascus leucogenys – samice Faranga (ZOO Ústí n. L.): 2^{3/4} - 3,5 roku

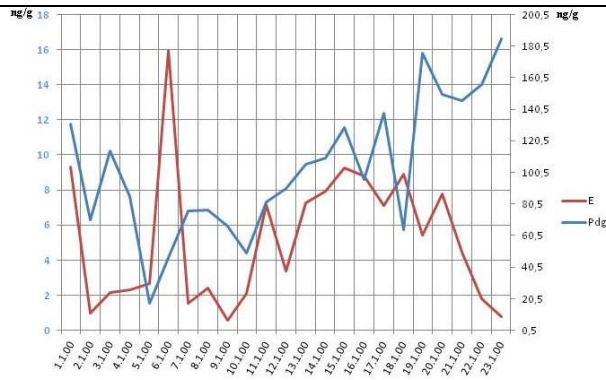


Nomascus leucogenys – samice Faranga (ZOO Ústí n. L.): 3,5 – 4,5 roku



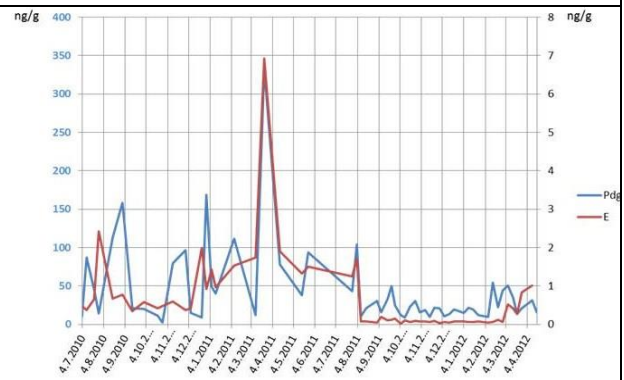
Nomascus gabriellae – samec Dien (ZOO Bojnice):

3 ³/₄ - 4 ¹/₃ roku



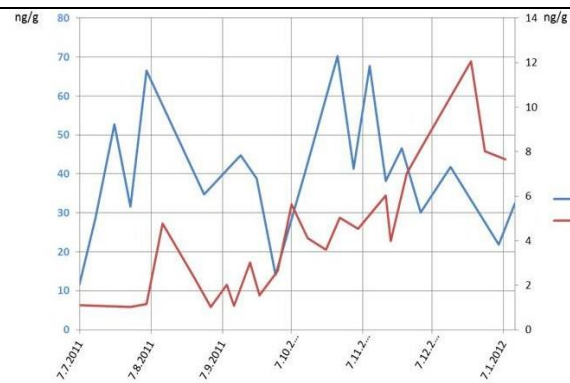
Nomascus leucogenys – samice Shanti (ZOO Liberec):

4 ¹/₃ – 6 let



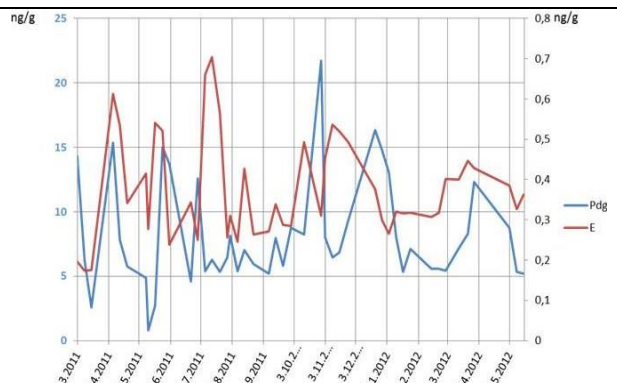
Nomascus gabriellae – samec M-Tody (ZOO

Varšava): 4 ¹/₃ – 4 ³/₄ roku



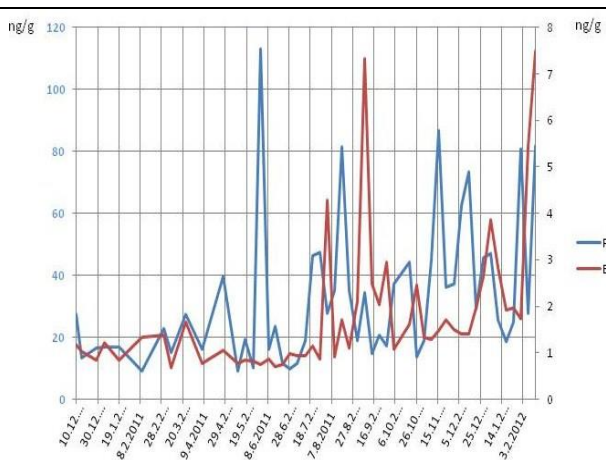
Nomascus gabriellae – samice Linda (ZOO

Bratislava): 4 – 5 ¹/₃ roku



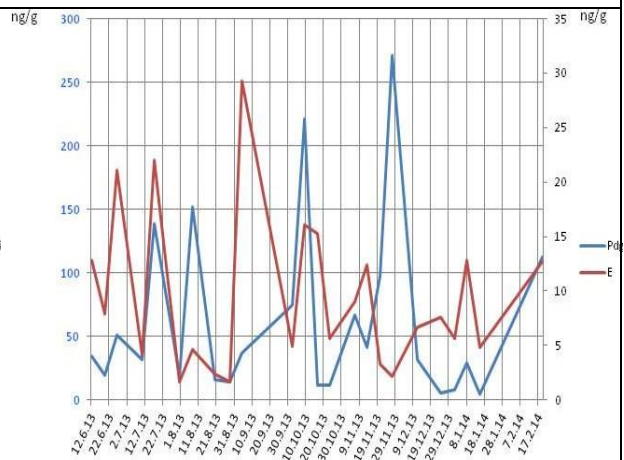
Nomascus leucogenys – samice Beaunt (ZOO Ústí n.

L.): 4 ¹/₃ – 5,5 let

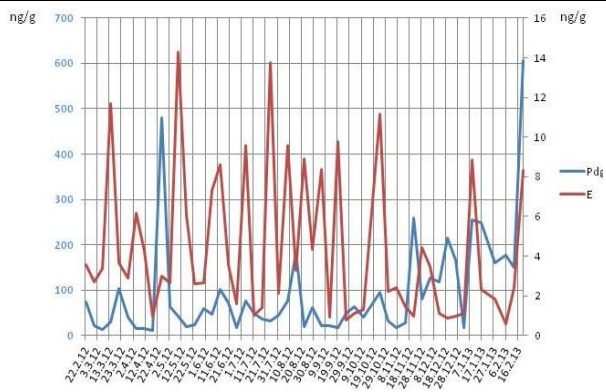


Nomascus leucogenys – samice Faranga (ZOO Ústí n.

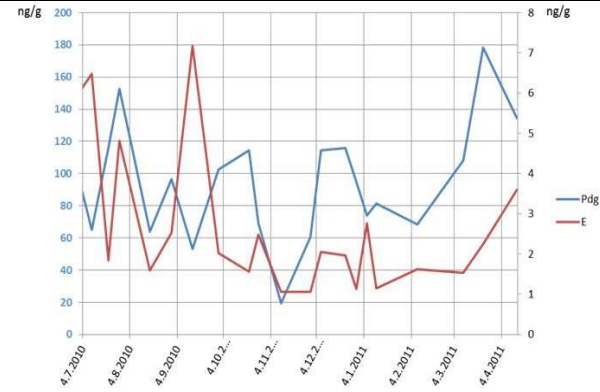
L.): 4 ³/₄ - 5,5 let



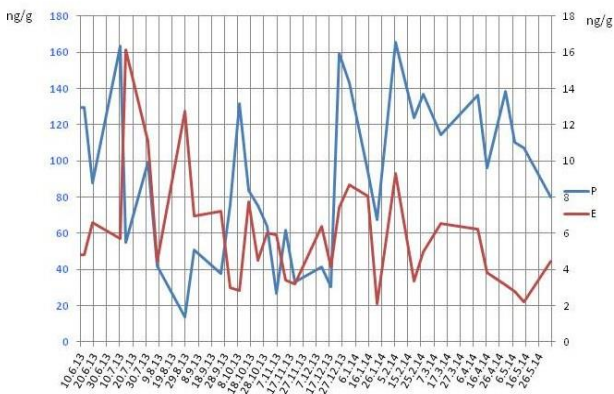
Nomascus leucogenys – samice Beaunt (ZOO Ústí n.L.): 5,5 – 6^{1/3} let



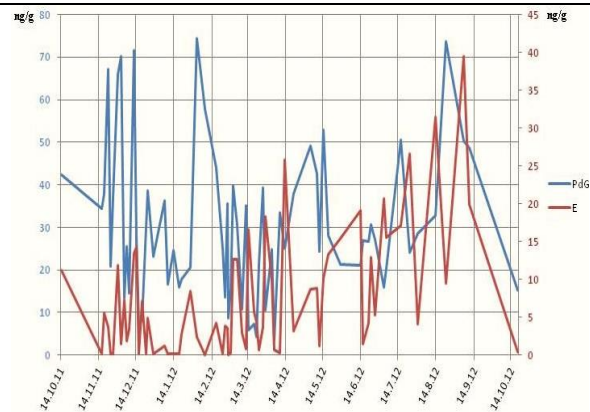
Nomascus leucogenys – samice Shanti (ZOO Asson): 6^{1/3} – 6^{3/4} roku



Nomascus leucogenys – samice Beaunt (ZOO Ústí n.L.): 6^{3/4} - 7^{3/4} roku

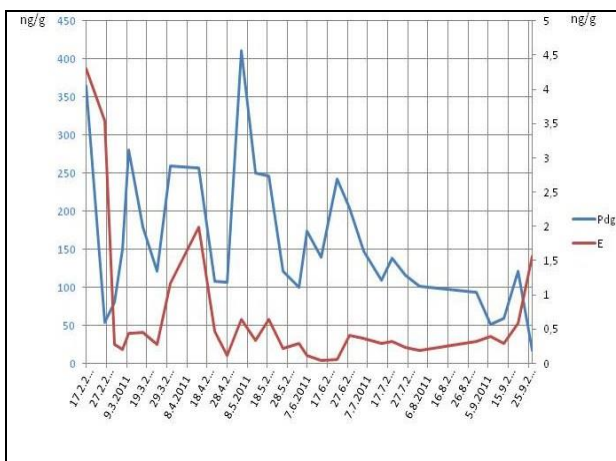


Nomascus leucogenys – samec Xian (ZOO Plzeň): 6^{3/4} - 7^{3/4} roku

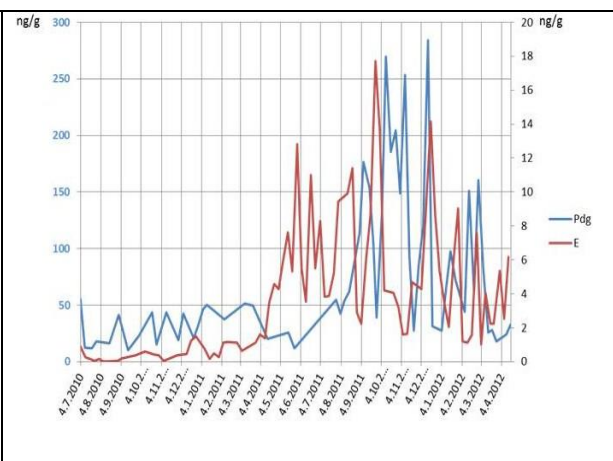


Nomascus gabriellae – samec Dan (ZOO Olomouc): 7^{1/3} – 7^{3/4} roku

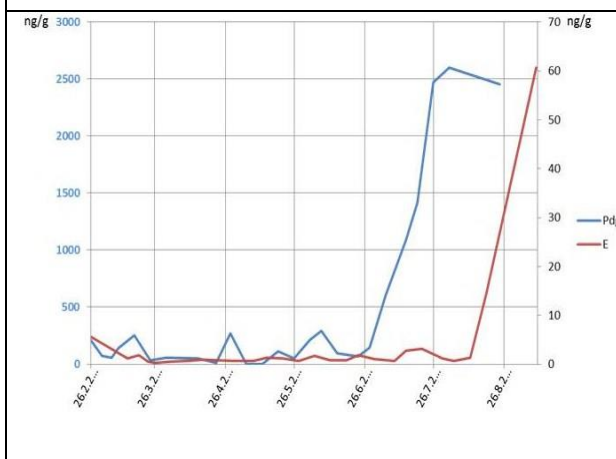
Nomascus leucogenys – samec Samun (ZOO Ústí n.L.): 7,5 – 8^{1/3} roku



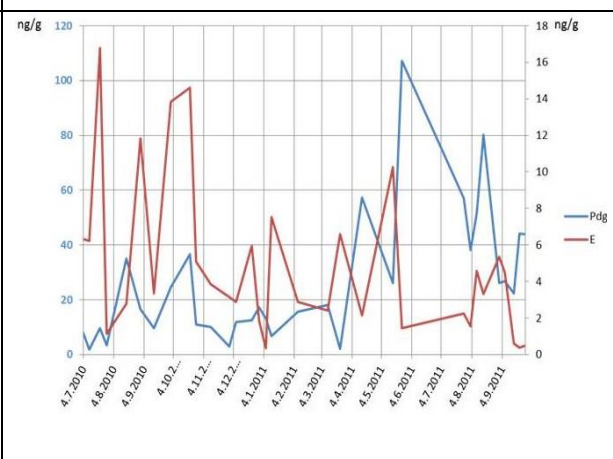
Nomascus gabriellae – samice Rony (ZOO Olomouc):
7 ³/₄ - 8 ¹/₃ roku



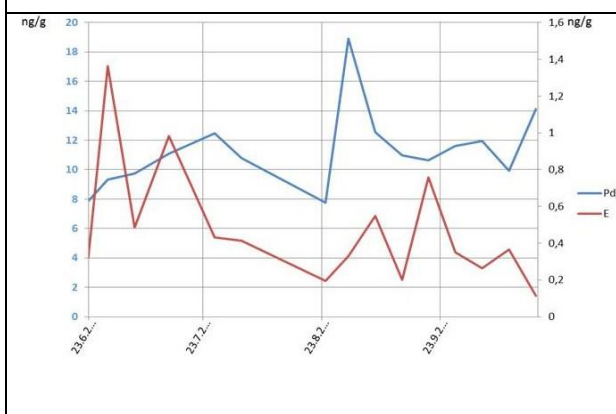
Nomascus leucogenys – samec Samun (ZOO Ústí n. L.): 8,5 – 10,5 let



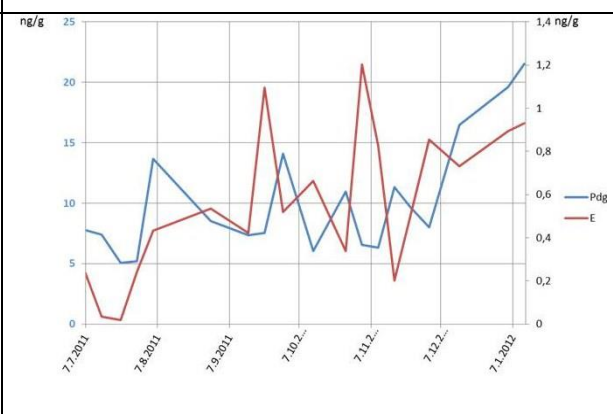
Nomascus gabriellae – samec Hošík (ZOO Olomouc):
9 ¹/₃ – 9 ³/₄ roku



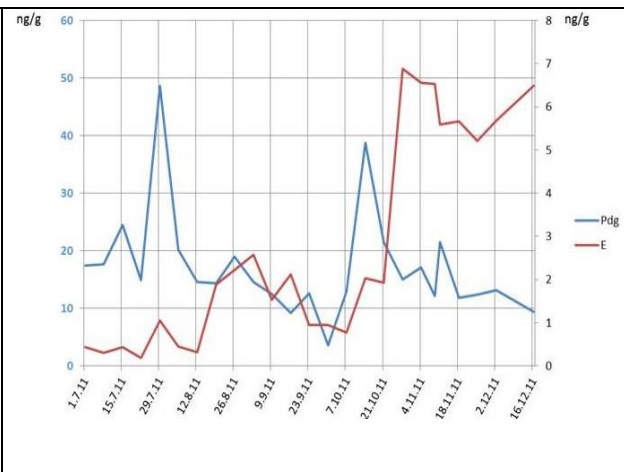
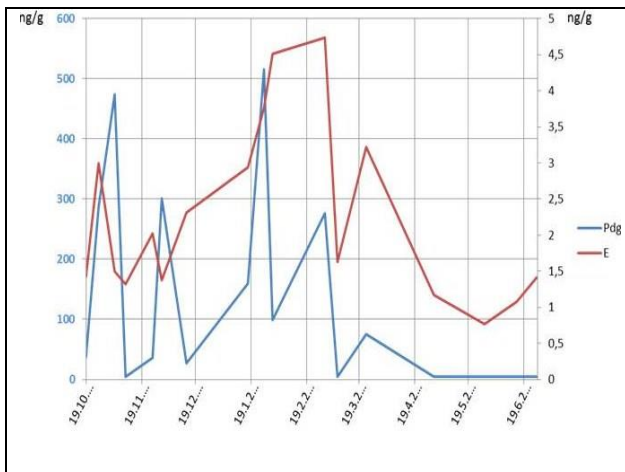
Nomascus gabriellae – samec Oliver (ZOO Bratislava): 10 ¹/₃ – 10 ³/₄ roku



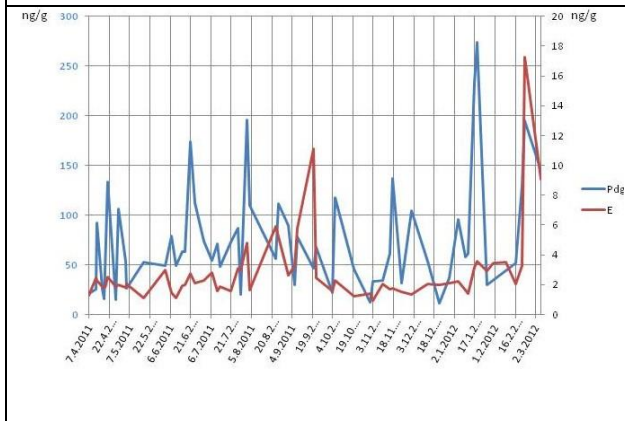
Nomascus leucogenys – samice Malou (ZOO Eskilstuna): 11 – 11 ³/₄ roku



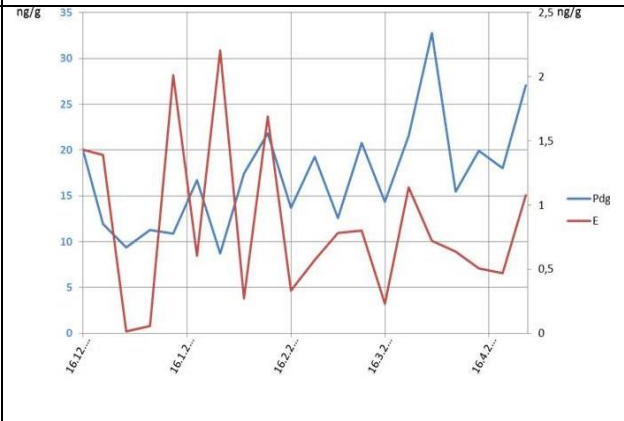
Nomascus leucogenys – samice Sulu (ZOO Ostrava):
11 ¹/₃ – 11 ³/₄ roku



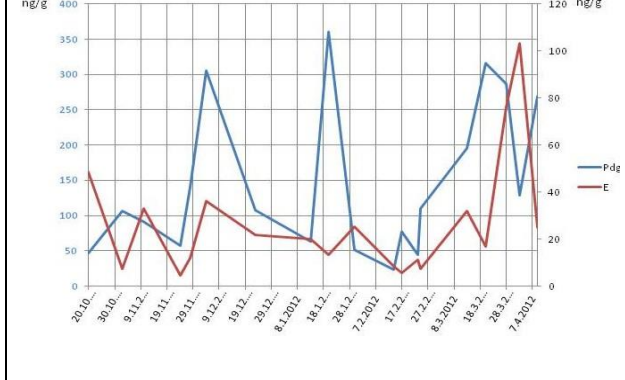
Nomascus gabriellae – samice Zlata (ZOO Jihlava):
11 ³/₄ - 12,5 let



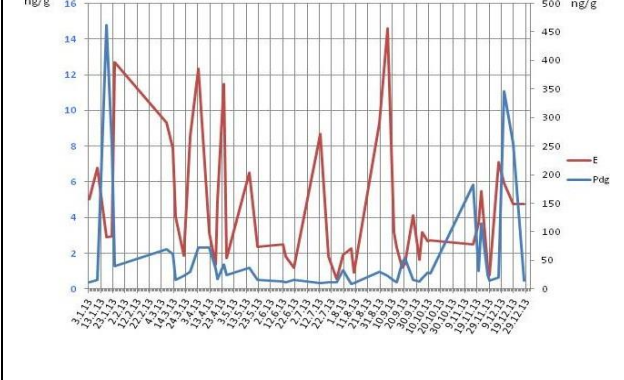
Nomascus gabriellae – samice Lili (ZOO Bojnice):
11 ³/₄ – 12 let



Nomascus leucogenys – samice Eli (ZOO Lyon):
12 – 12,5 let

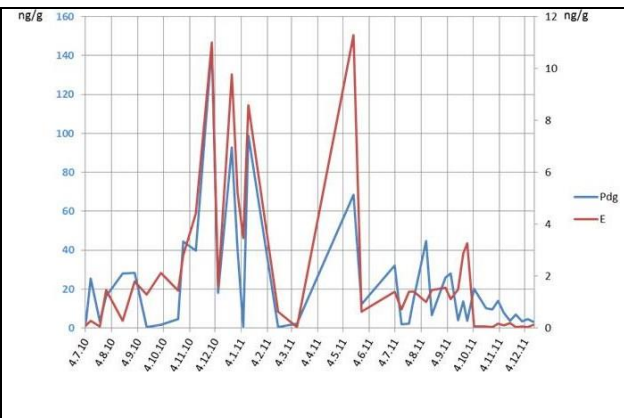
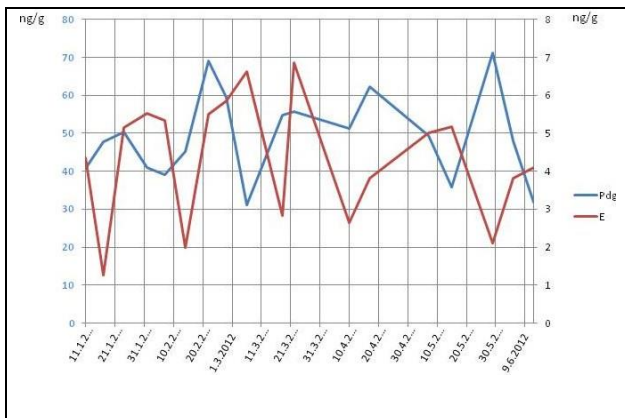


Nomascus gabriellae – samice Zlata (ZOO Jihlava):
13 ¹/₃ – 14 ¹/₃ roku

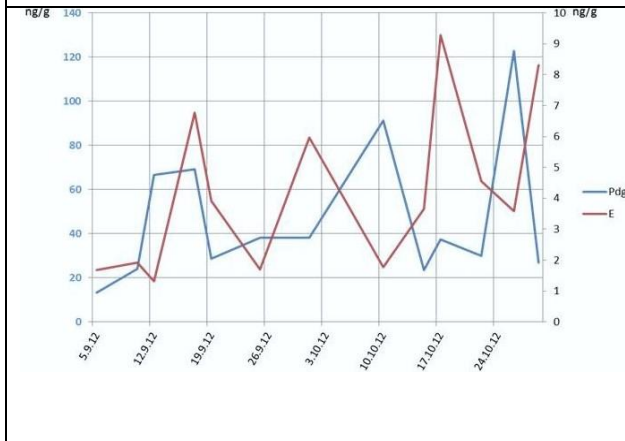


Nomascus gabriellae – samec Bonifác (ZOO Olomouc): 14 – 14,5 let

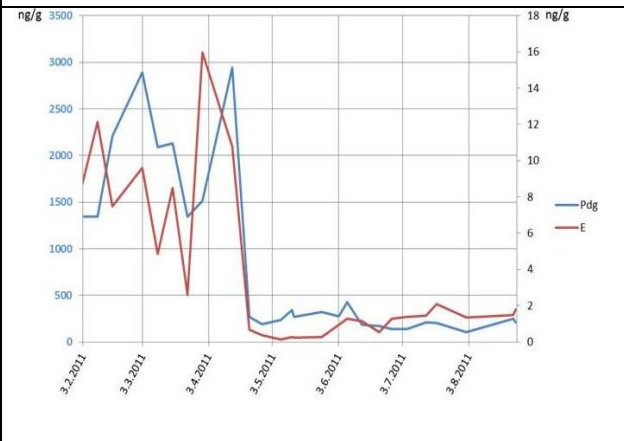
Nomascus leucogenys – samice Wen-Wen (ZOO Liberec): 16 ³/₄ - 18 ¹/₃ roku



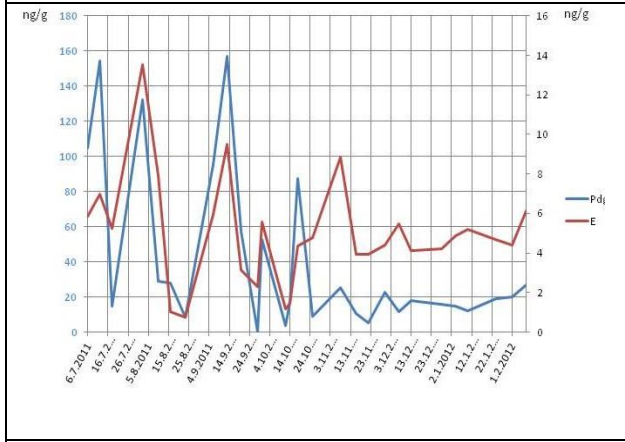
Nomascus leucogenys – samice Wen-Wen (ZOO Liberec): 18 ³/₄ - 19 ¹/₃ roku



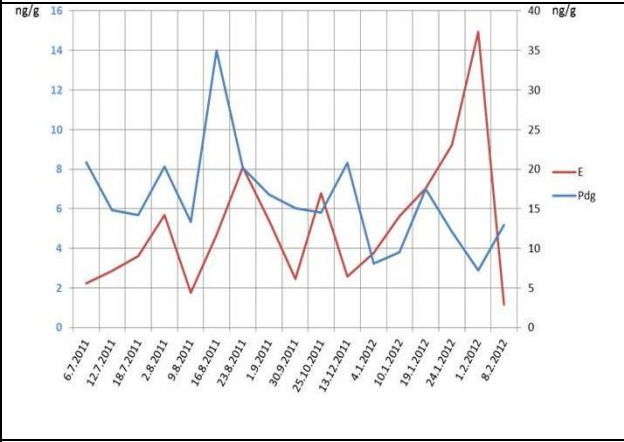
Nomascus gabriellae – samice Miloš (ZOO Olomouc): 19 – 19 ³/₄ roku



Nomascus gabriellae – samice Bonia (ZOO Varšava): 19 ¹/₃ – 19 ³/₄ roku

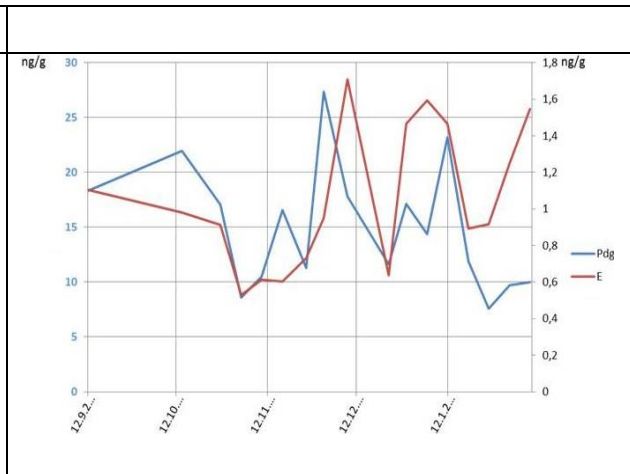
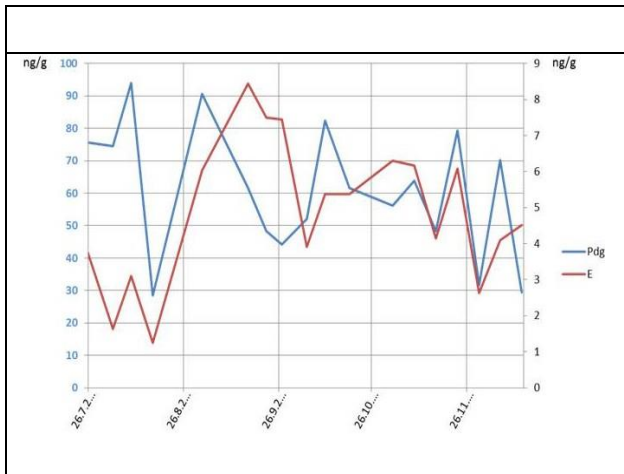


Nomascus gabriellae – samec Guccio (ZOO Varšava): 20 – 20,5 let

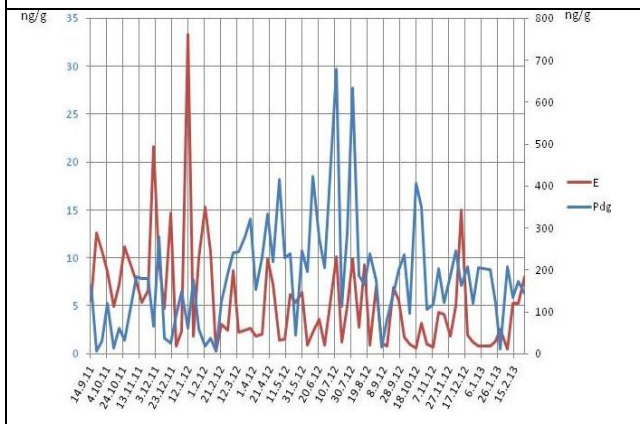


Nomascus leucogenys – samec Matýsek (ZOO Liberec): 20 ¹/₃ – 20 ³/₄ roku

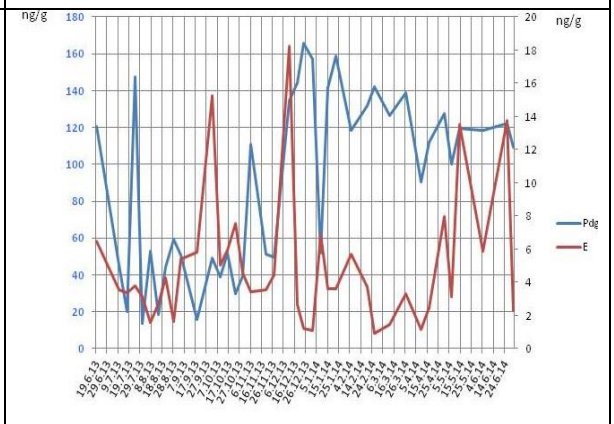
Nomascus gabriellae – samice Liling (ZOO Ljubljana): 24 ¹/₃ – 24 ³/₄ roku



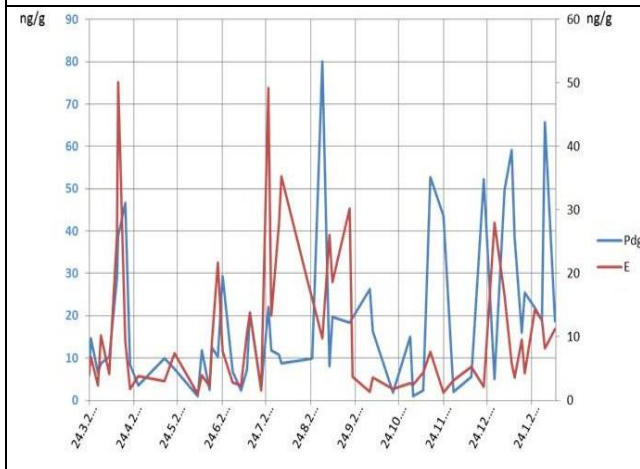
Nomascus leucogenys – samice Fey (ZOO Ústí n. L.):
25 ¾ - 26,5 let



Nomascus leucogenys – samice Fey (ZOO Ústí n. L.): 26,5 – 28,5 let



Nomascus gabriellae – samice Ivana (ZOO Jihlava):
27 1/3 – 28 let



Nomascus gabriellae – samice Ivana (ZOO Jihlava): 29 – 30 let

