

DOI: 10.7868/S2658655X26050094
УДК 598.8:577.175.5

Методическая статья

Определение метаболитов кортикостерона в помете диких воробьиных птиц: метод неинвазивной оценки активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси

А.Л. Цвей^{1,*}, Ю.А. Лошагина², С.В. Найденко³

¹Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Российская Федерация

²Институт географии РАН, Москва, Российская Федерация

³Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН,
Москва, Российская Федерация

*E-mail: arseny.tsvey@zin.ru

Аннотация. В экофизиологических исследованиях все чаще применяются неинвазивные методы оценки гормонального статуса животных, что особенно важно для редких и уязвимых видов. У позвоночных животных важную роль в регуляции физиологии и поведения в ответ на изменение условий окружающей среды, в том числе на разнообразные стрессовые воздействия, играет гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось (ГГНО) и эффекторные гормоны этой системы – глюкокортикоиды. Целью данного исследования было определение возможности неинвазивной оценки активности ГГНО по измерению уровня метаболитов кортикостерона в помете у двух видов мигрирующих воробьиных птиц – зарянки (*Erithacus rubecula*) и садовой славки (*Sylvia borin*) – с помощью наборов для измерения кортикостерона EIA-4164 (DRG International Inc., США). Мы применили физиологическую валидацию (АКТГ-тест), что вызвало значительное увеличение концентрации кортикостерона в плазме крови и последующее увеличение количества метаболитов кортикостерона в помете птиц. У обоих видов наибольшее количество метаболитов наблюдалось в помете, выделенном в течение трех часов после инъекции АКТГ, что согласуется со временем прохождения пищи через кишечник. У многих птиц экспериментальные процедуры (забор крови и инъекция АКТГ) вызывали кратковременное прекращение питания, что приводило к отрицательной корреляции между массой помета и концентрацией метаболитов кортикостерона в помете, т.е. концентрации метаболитов кортикостерона были выше в пробах с низкой массой помета. При значительной вариации интенсивности кормления выражение результатов в виде абсолютного количества метаболитов кортикостерона, выделенного за фиксированное время, устраняет артефакты, связанные с вариацией объема помета, и обеспечивает более точную оценку гормонального статуса по сравнению с использованием их концентрации. Данное исследование демонстрирует валидность использования набора EIA-4164 для неинвазивного мониторинга активности ГГНО у изучаемых видов и подчеркивает важность

учета массы выделенного за определенный промежуток времени помета для более точной оценки гормонального статуса.

Ключевые слова: гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось, глюкокортикоиды, кортикостерон, неинвазивные методы, иммуноферментный анализ, АКТГ-тест, воробьиные птицы

Финансирование. Работа выполнена в рамках темы госзадания Зоологического института РАН № 125012800913-4, госзадания Института географии РАН FMWS-2026-0002 и при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 16-04-01773 и № 19-04-01219).

Соблюдение этических стандартов. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы содержания и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям. После окончания эксперимента птицы были выпущены обратно в природу.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

Вклад авторов в публикацию. ЦАЛ, НСВ – идея работы и планирование эксперимента; ЦАЛ, ЛЮА – сбор данных; НСВ, ЛЮА – лабораторный анализ проб; ЦАЛ – статистический анализ; ЦАЛ, ЛЮА, НСВ – написание и редактирование рукописи.

Благодарности. Авторы признательны Виталию Гринкевичу, Кириллу Афанову и Анастасии Волковой за помощь в проведении экспериментов. Вольфганг Гойман (Wolfgang Goymann) любезно предоставил АКТГ. Мы благодарим двух анонимных рецензентов за проявленный критицизм и предложения по улучшению текста рукописи.

Ссылка для цитирования: Цвей А.Л., Лошагина Ю.А., Найденко С.В. Определение метаболитов кортикостерона в помете диких воробьиных птиц: метод неинвазивной оценки активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова / Russian Journal of Physiology*. 2026. Т. 112. № 5. С. 1301–1330.
<https://doi.org/10.7868/S2658655X26050094>

Measurement of Corticosterone Metabolites in Droppings of Small Passerine Birds: a Noninvasive Method for Assessing HPA Axis Activity

A.L. Tsvey^{1,*}, Yu.A. Loshchagina², S.V. Naidenko³

¹*Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences,
St. Petersburg, Russian Federation*

²*Institute of Geography of the Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation*

³*Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation*

*E-mail: arseny.tsvey@zin.ru

Abstract. Non-invasive approaches for assessing endocrine status in animals are increasingly applied in ecophysiological studies, which is particularly important for rare and vulnerable species. In vertebrates, the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis and its effector hormones, glucocorticoids, play a key role in regulating physiology and behavior in response to environmental challenges, including various stressors. This study aimed to validate a non-invasive method for assessing HPA-axis activity by measuring corticosterone metabolites in droppings of two migratory passerine bird species: the European Robin (*Erithacus rubecula*) and the Garden Warbler (*Sylvia borin*), using EIA-4164 kits (DRG International Inc., USA). Physiological validation with an ACTH test induced a significant increase in plasma corticosterone concentrations, followed by a subsequent increase in corticosterone metabolite levels in droppings. In both species, peak metabolite levels were observed within three hours after ACTH injection, consistent with gastrointestinal transit time. Experimental procedures (blood sampling and ACTH injection) temporarily suppressed feeding activity in some birds, leading to a negative correlation between dropping mass and corticosterone metabolite concentration, i.e., metabolite concentrations were higher in samples with lower dropping mass. Given the considerable variation in feeding intensity in our experimental birds, expressing results as the absolute amounts of corticosterone metabolites excreted over a standardized time intervals reduced bias originating from dropping mass variation and provided a more reliable assessment of hormonal status than concentration-based measures. This study confirms the validity of the EIA-4164 assay for non-invasive monitoring of HPA-axis activity in the studied species and highlights the importance of accounting for dropping mass over standardized time to improve the accuracy of hormonal status assessments.

Keywords: hypothalamic-pituitary-adrenal axis, glucocorticoids, corticosterone, non-invasive methods, enzyme immunoassay, ACTH-test, passerine birds

Funding. The work was carried out within the framework of the state assignment of the Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences No. 125012800913-4, the state assignment of the Institute of Geography of the Russian Academy of Sciences FMWS-2026-0002, and was supported by the Russian Foundation for Basic Research (projects No. 16-04-01773 and No. 19-04-01219).

Ethics declarations. All applicable international, national, and/or institutional principles for the care and use of animals were followed. All procedures performed in animal studies complied with the ethical standards approved by the legal regulations of the Russian Federation, the principles of the Basel Declaration, and recommendations. Upon completion of the experiment, the birds were released back into the wild.

Conflict of interests. The authors declare no explicit or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Authors contribution. TsAL, NSV – conceptualization and experimental design; TsAL, LYuA – data collection; NSV, LYuA – laboratory analysis of samples; TsAL – statistical analysis; TsAL, LYuA, NSV – writing and editing the manuscript.

Acknowledgements. The authors are grateful to Vitaly Grinkevich, Kirill Afonov, and Anastasia Volkova for their assistance in conducting the experiments. Wolfgang Goymann kindly provided ACTH. We thank two anonymous reviewers for their constructive criticism and suggestions for improving the manuscript.

For Citation: Tsvey A.L., Loshchagina Yu.A., Naidenko S.V. Measurement of corticosterone metabolites in droppings of small passerine birds: a noninvasive method for assessing HPA axis activity. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova / Russian Journal of Physiology*. 2026;112(5):1301–1330. (In Russ.)
<https://doi.org/10.7868/S2658655X26050094>

ВВЕДЕНИЕ

У животных важную роль в регуляции поведения и физиологии в ответ на изменение условий окружающей среды, в том числе на разнообразные стрессовые воздействия, играет гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось (ГГНО) [1–3]. ГГНО можно рассматривать как совокупность функциональных взаимосвязей между 1) гипоталамусом, где специализированные нейроны секретируют кортиколиберин, 2) аденогипофизом, отдельные клетки которого продуцируют аденокортикотропный гормон (АКТГ), и 3) корой надпочечников, где синтезируются эффекторные гормоны – глюкокортикоиды (ГК) [4, 5]. В биомедицинских, физиологических и экологических исследованиях активность ГГНО определяют главным образом по концентрации ГК в крови. У птиц конечным продуктом ГГНО является кортикостерон [6].

В организме позвоночных животных ГК регулируют множество функций, связанных с поддержанием гомеостаза: энергетический метаболизм, состояние иммунной системы, физиологическую реакцию на стрессовые воздействия, функционирование сердечно-сосудистой и нервной систем, а также влияют на рост и развитие [4, 7]. Эффекты ГК зависят от концентрации и длительности воздействия этих гормонов [1, 4]. Базовые концентрации ГК отражают их уровень

в естественных условиях окружающей среды на определенной стадии годового цикла. Вариации базовой концентрации связаны в основном с регуляцией метаболизма [8]. Кроме того, концентрация ГК резко увеличивается в ответ на разнообразные стрессирующие воздействия, что вызывает физиологические и поведенческие эффекты, направленные на избежание негативных последствий такого воздействия [1]. Адренкортикальная реакция в ответ на стрессовые воздействия приводит к перераспределению ресурсов внутри организма, в результате чего приоритетными становятся процессы, связанные с непосредственным выживанием (мобилизация энергетических резервов, усиление двигательной активности и когнитивных функций), при этом снижаются энергетические затраты на размножение, поддержание активности иммунной системы и т.д. [9]. Недавние исследования показывают, что увеличение концентрации ГК в ответ на стрессирующие воздействия вызывает дальнейшее увеличение метаболизма, поэтому диапазон вариации концентрации ГК в крови представляет собой не различные состояния, а непрерывный континуум [10–12].

В экофизиологических исследованиях часто требуется оценить вариацию базовой концентрации ГК, связанную с действием различных факторов, не являющихся острыми стрессорами: антропогенной нагрузкой, сезонным изменением плотности популяции, погодными условиями, доступностью корма и т.д. Измерение базовой концентрации ГК в крови является методически сложной задачей, так как концентрация этих гормонов быстро увеличивается при отлове и заборе крови (в среднем, через 2–3 мин с момента отлова) [13, 14]. Поэтому в экофизиологических исследованиях, особенно проводимых на охраняемых/редких видах, активность ГГНО часто оценивают с помощью неинвазивного определения метаболитов ГК в помете/фекалиях [15–19]. В отличие от концентрации ГК в крови, которая может быстро меняться в течение минут, количество метаболизированных ГК является интегральным показателем активности ГГНО в течение более длительного периода времени (от последних нескольких часов до суток, в зависимости от вида животного) [20–22]. Таким образом, уровень метаболитов ГК в помете/фекалиях может отражать долго-среднесрочный уровень энергетического метаболизма, двигательной активности или величины физиологического ответа на изменения окружающей среды.

Определение активности ГГНО с помощью анализа метаболитов ГК в помете/фекалиях также имеет ряд трудностей [22–24]. Одной из основных проблем является незнание точной химической структуры определяемых метаболитов и, следовательно, отсутствие готовых коммерческих наборов реагентов для проведения такого анализа. Нативные ГК в помете/фекалиях практически отсутствуют [24–26]. Транспортируемые кровью ГК связываются с рецепторами в тканях с последующей деактивацией либо метаболизируются в печени. В тканях ГК деактивируются с помощью 11β -гидроксистероиддегидрогеназы 2-го типа (11β -HSD2), в результате чего образуется биологически неактивный кортизон, который далее транспортируется с кровью в печень. В печени нативные ГК и кортизон активно преобразуются путем конъюгации с глюкуроновой кислотой или сульфатирования, что повышает их водорастворимость и облегчает экскрецию. После конъюгации часть метаболитов ГК выделяется с мочой, другая, обычно большая, часть попадает в желчь и далее в ЖКТ. На примере воробьиной птицы, черноголового чекана (*Saxicola torquata*), было показано, что значительная часть метаболитов выводится именно через кишечник [26]. В кишечнике метаболиты ГК подвергаются дальнейшей модификации

под воздействием бактерий, включая деконъюгацию [7, 24, 25, 27]. В результате у разных видов животных или даже особей разного пола, или у одних и тех же особей на разных стадиях годового цикла может различаться состав метаболитов ГК [20, 21, 23, 25]. Наличие разных метаболитов ГК ведет к необходимости проведения валидационных исследований, чтобы подтвердить, что данный набор реактивов способен количественно определять изменение активности ГГНО (вариацию концентрации ГК в плазме крови) по количеству метаболитов в помете/фекалиях [21, 22, 25].

В экофизиологических исследованиях существуют два лабораторных подхода для определения метаболитов ГК в помете/фекалиях. Наиболее распространенным является использование коммерческих наборов реактивов, изначально предназначенных для определения конкретного ГК (кортизола или кортикостерона в зависимости от вида животного) в плазме крови [17–19, 26, 28, 29]. При этом подразумевается, что функциональные группы (эпитопы), с которыми связываются специфические антитела коммерческих наборов, остаются неизменными (или функционально активными) у метаболитов в помете/фекалиях. С помощью введения радиомеченного кортикостерона черноголовым чеканом *Goymann* с соавт. [26] показали, что даже у одной особи кортикостерон экскретируется в виде множества различных метаболитов и что используемые антитела к кортикостерону имеют кросс-реактивность к большинству из них. В отдельных случаях используются антитела к конкретным известным метаболитам [23, 27, 30]. Также может проводиться сравнительный анализ эффективности разных антител по способности отражать изменения концентрации ГК в крови у конкретного вида [20, 31–33]. Так как метаболиты ГК выводятся в виде конъюгированных и неконъюгированных форм, в некоторых ранних работах экстракты дополнительно подвергались ферментативному гидролизу, чтобы расщепить конъюгаты [26, 34]. В ряде последних работ этот этап опускается [32, 33, 35], так как показано, что корректные способы экстракции метаболитов ГК из помета увеличивают количество неконъюгированных метаболитов [36].

Отдельная методическая сложность заключается в выборе способа представления и биологическая интерпретация полученных результатов. В большинстве исследований приводится концентрация метаболитов ГК (нг/г). В то же время концентрация метаболитов часто связана с количеством съеденного корма и, соответственно, с количеством помета, в котором содержатся метаболиты ГК [21, 22, 37]. Динамика выделения метаболитов ГК с пометом/фекалиями зависит в том числе от скорости метаболизма ГК в печени, времени их нахождения в кишечнике и, следовательно, от динамики дефекации животного, что может варьировать индивидуально. Поэтому интерпретация физиологического статуса животного на основе определения метаболитов ГК требует тщательного учета всех вышеперечисленных моментов.

Целью данного исследования является валидация метода неинвазивной оценки активности ГГНО у модельных видов воробьиных птиц по уровню метаболитов кортикостерона в помете. С помощью коммерческого набора реактивов для определения кортикостерона методом иммуноферментного анализа мы оценивали, происходит ли увеличение количества определяемых метаболитов ГК в помете после увеличения концентрации кортикостерона в плазме крови. Отдельной задачей является сравнение способов выражения полученных результатов: в виде концентрации метаболитов кортикостерона (нг/г) или общего количества метаболитов кортикостерона (нг), выделенного за определенное время.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для валидации методики определения метаболитов кортикостерона в помете мы использовали физиологический подход и применили АКТГ-тест [19, 22]. В качестве модельных видов были выбраны два вида воробьиных птиц: зарянка (*Erithacus rubecula*) и садовая славка (*Sylvia borin*). Эти виды часто используются в экофизиологических исследованиях сезонных миграций птиц [38–42]. Исследование проводили на Биологической станции «Рыбачий» Зоологического института РАН (Куршская коса, Калининградская область, 55°09' с.ш., 20°51' в.д.). Эксперименты были проведены в апреле 2011 г. (зарянки) и в сентябре 2017 г. (садовые славки), т.е. во второй половине миграционных сезонов, характерных для каждого вида. Восемь особей каждого вида (первогодков) были отловлены паутинными сетями и акклиматизированы к условиям неволи в индивидуальных клетках (40 × 40 × 40 см), расположенных в закрытой вольере. Период акклиматизации составил 7–17 дней для всех птиц, кроме одной садовой славки, отловленной за три дня до начала эксперимента. Птицы содержались при естественном фотопериоде, температуре 18–22 °С, со свободным доступом к корму и воде (*ad libitum*). В период акклиматизации птицы получали мягкий корм собственного приготовления (смесь вареных яиц, тертой моркови, белых сухарей и сыра) с добавлением мучных червей, ягод бузины и витаминов. Во время эксперимента птиц кормили только мучными червями, чтобы разбрасываемый корм было легко собрать и отделить от помета и чтобы различия в диете не могли повлиять на состав экскретируемых метаболитов [21, 24]. Суммарно помет собирали в течение трех дней (рис. 1): в первый и третий дни в течение 3 ч (7:00–10:00), во второй день в течение четырех 3-часовых интервалов (7:00–19:00), т.е. в течение всего светового дня. Помет собирали на покрытые пищевой алюминиевой фольгой листы картона, размещенные на дне клеток, которые меняли в конце каждого 3-часового интервала. Помет, выделенный за три часа, количественно переносили на предварительно взвешенные кусочки фольги, взвешивали и замораживали при –20 °С до дальнейшего анализа. В 10:00 второго дня (в самом конце первого 3-часового интервала) у птиц брали пробы крови для определения базового уровня кортикостерона. Время взятия проб крови для определения базового уровня кортикостерона варьировало от 56 с до 5 мин 15 с и составляло в среднем 2 мин 30 с ± 1 мин 6 с (*SD*). После взятия проб крови птицам с помощью инсулинового шприца внутривентриально вводили АКТГ (#A0298, fragment 1-24, human-rat, Sigma-Aldrich) в дозе 2 мкг, растворенных в 100 мкл физиологического раствора. Для контроля эффективности инъекции АКТГ через 1 ч (в 11:00) брали вторую пробу крови. Пробы крови центрифугировали и плазму замораживали до дальнейшего анализа. После окончания всех процедур птицы были выпущены обратно в природу.

Лабораторный анализ. Анализ проб проводили в Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (Москва) на базе ЦКП «Живая коллекция диких видов млекопитающих». Были проанализированы пробы помета только у тех птиц, у которых введение АКТГ вызывало значительное увеличение концентрации кортикостерона в крови (см. результаты). Для экстракции метаболитов кортикостерона помет высушивали при 55 °С в сушильном шкафу в течение ночи. Высушенные образцы повторно взвешивали и гомогенизировали. Затем 0,1 г помета переносили в пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл и добавляли 0,9 мл 60%-ного раствора метанола. Выбранная концентрация рекомендована для экстракции метаболитов кортикостерона у птиц и используется во многих исследованиях [22, 27, 34].

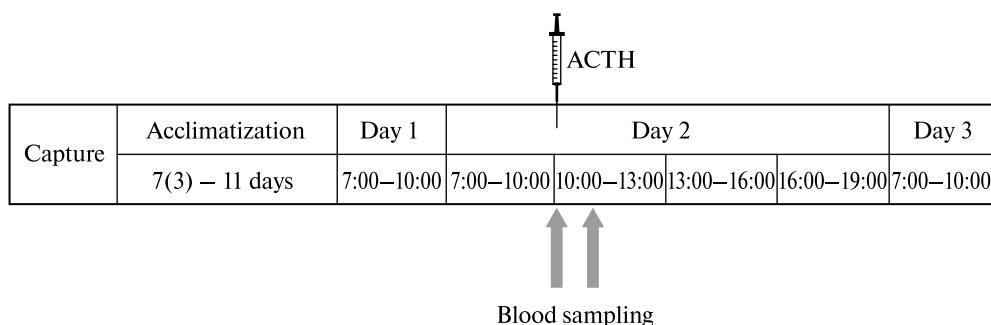


Рис. 1. Схема эксперимента: указаны временные интервалы количественного сбора проб помета, стрелочками показан сбор проб крови для измерения уровня кортикостерона до и после введения АКТГ, пиктограмма шприца обозначает момент введения АКТГ

Fig. 1. Experimental design: time intervals of quantitative dropping collection are shown, arrows indicate blood sampling for corticosterone measurements before and after ACTH injection, the syringe icon denotes the time point of ACTH injection

Эта концентрация обеспечивает высокую степень экстракции неконъюгированных форм метаболитов ГК и обеспечивает низкую итоговую концентрацию метанола в лунках планшета (см. ниже), что избавляет от необходимости выпаривания метанола после экстракции [36]. Пробирки встряхивали в течение 30 мин на мини-ротаторе Bio RS-24 (Biosan, Латвия) при 30 об/мин, затем центрифугировали в течение 10 мин при 4000 об/мин (Eppendorf 5424). После центрифугирования 400 мкл надосадочной жидкости (супернатанта) переносили в новые пробирки, добавляли 200 мкл дистиллированной воды и замораживали при -20°C до дальнейшего анализа; концентрация метанола в замороженных пробах составляла 40%.

Для анализа концентрации кортикостерона в плазме крови и уровня метаболитов кортикостерона в помете использовали наборы EIA-4164 (DRG International Inc., США). Данный набор ранее был валидирован для измерения кортикостерона в плазме крови у изучаемых видов [40, 42]. Плазму для анализа разбавляли фосфатно-солевым буфером (PBS) в соотношении 1 : 1. Концентрацию кортикостерона определяли непосредственно в разбавленной плазме, следуя инструкции производителя, с использованием микропланшетного фотометра Multiskan FC (Thermo Scientific; Финляндия) и ПО SkanIt Software RE for Microplate Readers RE, вер. 6.1.0.51. Согласно спецификации производителя, перекрестная реактивность (cross-reactivity) антител к другим стероидам составляла: к прогестерону – 7,4%, к дезоксикортикостерону – 3,4%, к 11-дегидрокортикостерону – 1,6%, к кортизолу и прегненолону – 0,3%, к другим стероидам – $<0,1\%$.

Для измерения концентрации метаболитов кортикостерона в помете самый высокий стандарт из набора реактивов (концентрацией 83,16 нг/мл) был разбавлен 40%-ным метанолом до концентрации 80 нг/мл. Далее полученный стандарт серийно разбавляли (1 : 1 по объему) 40%-ным раствором метанола шесть раз. Таким образом, было получено семь стандартов с концентрацией 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 и 1,256 нг/мл. Последний стандарт представлял собой чистый 40%-ный раствор метанола. После приготовления, по аналогии с пробами, стандарты были заморожены и затем разморожены непосредственно перед измерениями. Концентрацию метаболитов

кортикостерона в образцах анализировали аналогично пробам крови, только использовали приготовленные стандарты вместо стандартов производителя. Конечная концентрация метанола в лунке составила 3,6% (к 20 мкл образца, содержащего 40% метанола, добавляли 200 мкл конъюгата), что не ингибирует реакцию связывания антител со стероидами [23, 36]. Все образцы анализировали в парных измерениях. Диапазон стандартной кривой варьировал от 0 до 80 нг/мл (на рис. 2 приведен пример стандартных кривых, использованных для расчета концентрации метаболитов кортикостерона в помете и концентрации кортикостерона в плазме крови садовых славок). Образцы, выходящие за верхний предел стандартной кривой (только для зарянок, $n = 5$), были повторно проанализированы при большем разведении. Пробы зарянок попадали в диапазон между стандартами 3 (5 нг/мл) и 7 (80 нг/мл), большинство – между стандартами 5 и 6 (20–40 нг/мл). Пробы славок попадали в диапазон между стандартами 1 и 5 (от 1,25 до 20 нг/мл), большинство – между стандартами 3 и 4 (5–10 нг/мл). Всего было использовано четыре планшета – отдельно для проб крови и помета для каждого вида птиц. Внутрипланшетный коэффициент вариации составил: зарянки – кровь 1,32% ($n = 16$), помет 1,98% ($n = 42$); садовые славки – кровь 2,98% ($n = 16$), помет 4,39% ($n = 30$). Межпланшетный коэффициент вариации для проб крови составил 8,32% ($n = 2$), для проб помета – 14,1% ($n = 2$).

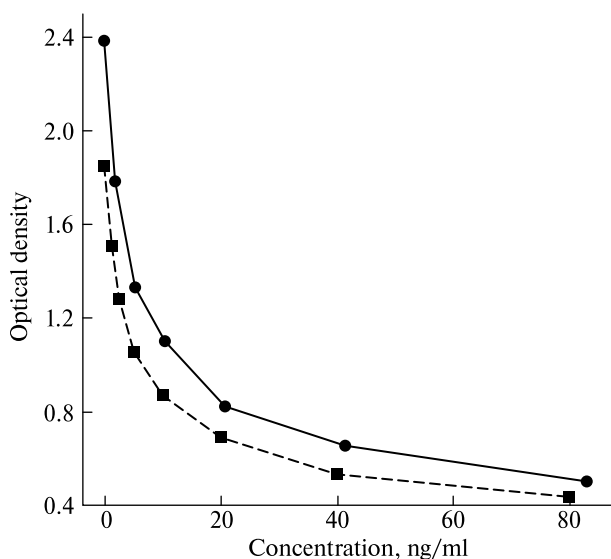


Рис. 2. Стандартные кривые, используемые для расчета концентрации кортикостерона в плазме крови и концентрации метаболитов кортикостерона в помете у садовой славки. Стандартные кривые выполнены на основе стандартов набора для измерения кортикостерона EIA-4164 (DRG International Inc., США); сплошная линия построена на основе стандартов без модификации метанолом (круги), штриховая линия – стандартная кривая для стандартов, модифицированных метанолом (квадраты)

Fig. 2. Standard curves used for the quantification of corticosterone concentrations in plasma and corticosterone metabolite concentrations in droppings of the Garden Warbler. The standard curves were generated using the standards from the corticosterone EIA-4164 assay (DRG International Inc., USA); the solid line represents the curve based on unmodified standards (circles), and the dashed line represents the standard curve for methanol-modified standards (squares)

Статистический анализ. Анализ выполнили в среде R 4.0.5¹. Изменение концентрации кортикостерона в плазме крови в ответ на введение АКТГ оценивали с помощью критерия Уилкоксона для парных измерений. Анализ динамики экскреции метаболитов кортикостерона в течение трех экспериментальных дней проводили с помощью смешанных линейных моделей: функция *lmer*, библиотека *lme4* [43]. В качестве зависимой переменной выступали: а) концентрация метаболитов кортикостерона (нг/г); б) количество метаболитов кортикостерона (нг), выделившееся за три часа; для нормализации распределения оба показателя были \log_{10} трансформированы. Шесть 3-часовых интервалов (по одному интервалу в первый и третий день, четыре интервала во второй день) включили как фактор. В качестве референсного интервала, который отражает базовый уровень концентрации/количества метаболитов кортикостерона и с которым сравниваются все остальные интервалы, служил первый 3-часовой интервал второго дня эксперимента. ID особи включили как случайный фактор, чтобы учесть повторные измерения для одних и тех же птиц. Достоверность различий между базовым уровнем и остальными 3-часовыми интервалами оценивали с помощью библиотеки *lmerTest*, функции *summary* [44]. Виды анализировали раздельно. Для оценки связи между параметрами использовали непараметрический коэффициент корреляции Спирмена. Результаты выражены как медиана и (межквартильный размах, IQR).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Базовая концентрация кортикостерона в плазме крови составила 1,7 (IQR 1,6) нг/мл, $n = 8$ у зарянки и 19,0 (IQR 2,2) нг/мл, $n = 8$ у садовой славки. Через один час после инъекции АКТГ концентрация кортикостерона возросла до 13,8 (IQR 8,2) нг/мл у зарянки и до 29,7 (IQR 25,9) нг/мл у садовой славки (рис. 3). Увеличение было статистически значимым (критерий Уилкоксона: зарянка: $V = 0$, $p = 0,008$, $n = 8$; садовая славка: $V = 3$, $p = 0,04$, $n = 8$). Однако повышенные концентрации кортикостерона после инъекции АКТГ наблюдалось не у всех птиц: у одной зарянки и двух садовых славок концентрация возросла менее чем на 6 нг/мл, еще у одной садовой славки концентрация кортикостерона снизилась на 6 нг/мл (рис. 3). В результате помет данных особей не был проанализирован на концентрацию метаболитов кортикостерона, и окончательные размеры выборок составили семь зарянок и пять садовых славок.

Концентрация метаболитов кортикостерона в помете в течение эксперимента варьировала от 120,9 до 2778,0 нг/г (медиана 448,1 (IQR 410,1) нг/г ($n = 42$)) у зарянки и от 61,2 до 581,7 нг/г (медиана 198,1 (IQR 129,6) нг/г ($n = 30$)) у садовой славки. У обоих видов была зафиксирована четкая динамика концентрации метаболитов кортикостерона в помете в течение трех экспериментальных дней (рис. 4). Инъекция АКТГ приводила к достоверному повышению концентрации метаболитов кортикостерона в течение трех последующих часов (рис. 4, табл. 1; зарянка: $t = 4,50$, $p < 0,001$; садовая славка: $t = 2,86$, $p = 0,004$). Концентрация увеличилась на 284% у зарянки и на 160% у садовой славки относительно значений первого интервала второго дня. Дальнейшая динамика концентрации метаболитов отличалась у двух видов (рис. 4). У зарянки через шесть часов после инъекции концентрация метаболитов в помете снизилась до самого низкого за три дня уровня и до конца

¹ R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2021. Режим доступа: <https://www.R-project.org> (дата обращения: 05.09.2025).

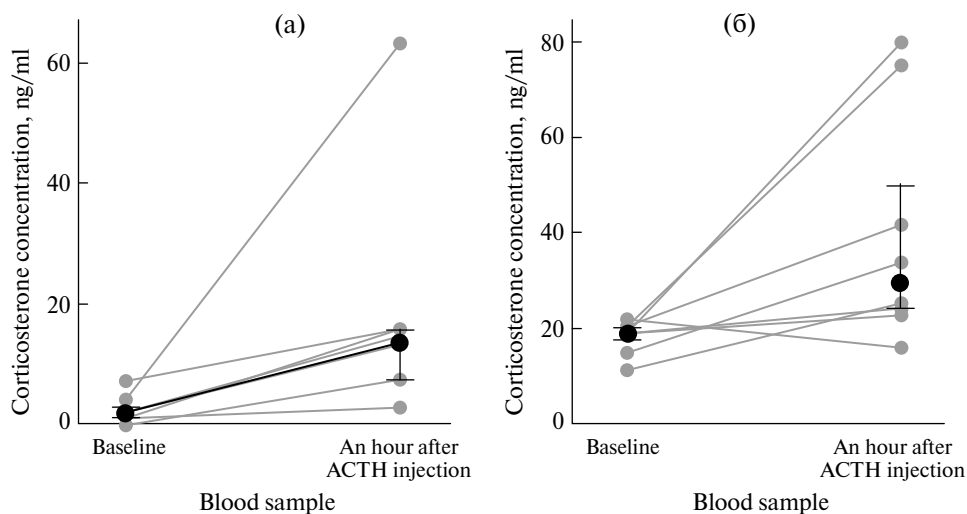


Рис. 3. Изменения концентрации кортикостерона в плазме крови через час после внутривисцерального введения АКТГ (2 мкг / 100 мкл физраствора): (а) – зарянки, (б) – садовые славки. Серым цветом показаны индивидуальные птицы, черные жирные точки отражают медианы, «усы» – межквартильный размах

Fig. 3. Changes in plasma corticosterone concentrations in one hour after intraperitoneal ACTH injection (2 µg / 100 µl physiological saline): (a) European Robins, (b) Garden Warblers. Individual birds are shown in grey, black bold dots represent median values, “whiskers” – interquartile range (IQR)

эксперимента варьировала на сходном с базовым уровне (рис. 4, табл. 1). У садовой славки повышенные концентрации метаболитов кортикостерона наблюдались до шести часов после инъекции, хотя различия по сравнению с базовым уровнем не достигали статистической значимости (рис. 4, табл. 1). Значительное снижение концентрации метаболитов кортикостерона происходило через девять часов после инъекции, в самый последний 3-часовой интервал второго дня эксперимента.

Манипуляции, связанные с забором крови и инъекцией АКТГ, приводили к уменьшению массы помета в течение трех последующих часов: у зарянки снижение было достоверно (критерий Уилкоксона, $V = 28$, $p = 0,02$, $n = 7$), у садовой славки – недостоверно ($V = 11$, $p = 0,44$, $n = 5$). У обоих видов концентрация метаболитов кортикостерона была статистически значимо отрицательно связана с массой помета (зарянка: $r = -0,44$, $p = 0,004$, $n = 42$, садовая славка: $r = -0,56$, $p = 0,001$, $n = 30$), т.е. самые высокие концентрации метаболитов кортикостерона наблюдались в случае, когда за три часа птицы выделяли меньше всего помета (рис. 5).

Количество метаболитов кортикостерона, выделившееся за три часа, варьировало от 7,9 до 176,4 нг (медиана 37,4 (IQR 35,3) нг ($n = 42$)) у зарянки и от 11,6 до 267,2 нг (медиана 46,2 (IQR 22,5) нг ($n = 30$)) у садовой славки. Оба вида показали сходную динамику экскреции метаболитов кортикостерона с учетом массы помета: количество выделенных метаболитов увеличилось в течение трех часов после инъекции АКТГ (зарянка: $t = 2,03$, $p = 0,04$, садовая славка: $t = 1,45$, $p = 0,15$), после чего наблюдалось снижение количества выделенных метаболитов до базового уровня (рис. 6, табл. 2). Инъекция АКТГ приводила к увеличению

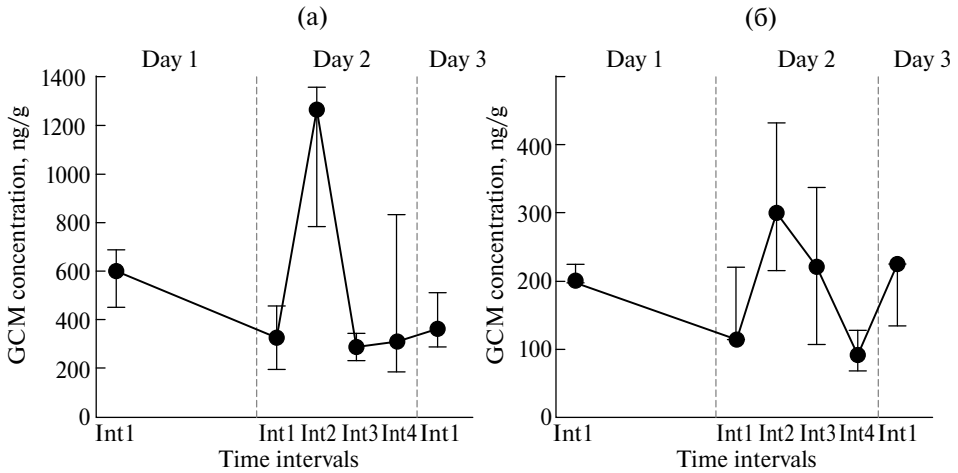


Рис. 4. Динамика концентрации метаболитов кортикостерона (нг/г) в помете у зарянок (а) и садовых славков (б) в течение эксперимента. Показаны медианы и межквартильный размах
Fig. 4. Dynamics of corticosterone metabolite (GCM) concentrations (ng/g) in droppings of European Robins (a) and Garden Warblers (b) during the experiment. Data are presented as median values and interquartile range

Таблица 1. Результаты смешанной линейной модели, тестирующей различия в концентрациях метаболитов кортикостерона (нг/г, данные логарифмированы) между первым 3-часовым интервалом второго дня эксперимента (перед введением АКТГ) и остальными 3-часовыми интервалами

Table 1. Results of a linear mixed-effects model testing differences in corticosterone metabolite concentrations (ng/g, log-transformed) between the first 3-hour interval on day 2 of the experiment (pre-ACTH injection) and the remaining 3-hour intervals

Фактор (временной интервал)	Зарянка				Садовая славка			
	Коэф.	SE	t	p	Коэф.	SE	t	p
(Intercept)*	2,48	0,09	27,26	<0,001	2,14	0,10	22,06	<0,001
День 2, инт. 2**	0,58	0,13	4,50	<0,001	0,31	0,11	2,86	<0,01
День 2, инт. 3	-0,05	0,13	-0,42	0,68	0,18	0,11	1,71	0,10
День 2, инт. 4	0,11	0,13	0,84	0,41	-0,15	0,11	-1,39	0,18
День 3, инт. 1	0,08	0,13	0,66	0,51	0,06	0,11	0,57	0,57
День 1, инт. 1	0,29	0,13	2,27	0,03	0,17	0,11	1,61	0,12
Случайный фактор (SD)								
ID	0,00				0,14			
Residual	0,24				0,17			

* Отражает концентрацию метаболитов кортикостерона в День 2, инт. 1, т.е. перед введением АКТГ.

** Интервал, следующий за введением АКТГ.

* Reflects corticosterone metabolite concentrations on Day 2, int. 1, i.e. pre-ACTH injection interval.

** Post-ACTH injection interval.

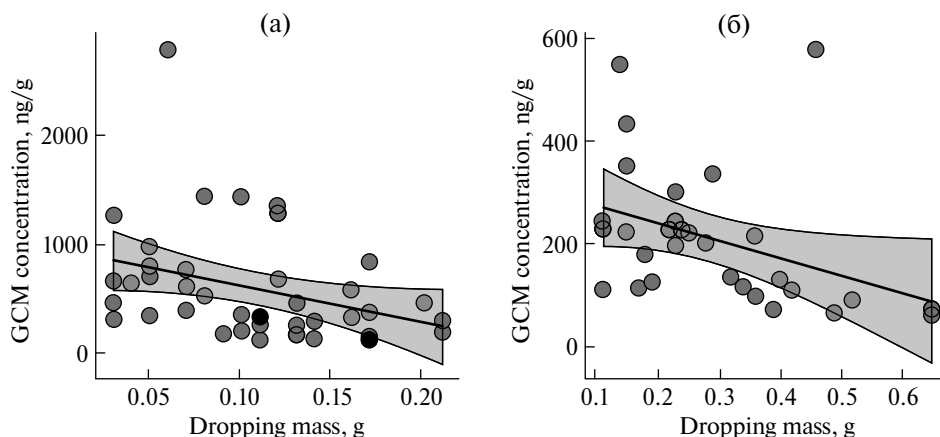


Рис. 5. Зависимость между концентрацией метаболитов кортикостерона (нг/г) и массой выделенного помета (г): (а) – зарянки, (б) – садовые славки. Серым цветом показан 95%-ный доверительный интервал

Fig. 5. Relationship between corticosterone metabolite (GCM) concentration (ng/g) and dropping mass (g): (a) European Robins, (b) Garden Warblers. Grey shading indicates the 95% confidence interval

количества метаболитов кортикостерона на 169% у зарянки и на 42% у садовой славки относительно значений первого интервала второго дня. В то же время анализ индивидуальных графиков показал, что у двух зарянок и одной садовой славки пики экскреции метаболитов кортикостерона приходились не на второй, а на третий–четвертый интервалы второго дня эксперимента, т.е. через 6–9 ч после инъекции АКТГ. Также у двух зарянок с максимальным количеством метаболитов кортикостерона, выделившегося через три часа после инъекции АКТГ, наблюдалось повторное увеличение экскреции метаболитов кортикостерона на третий день эксперимента, чего не было заметно при анализе динамики концентрации метаболитов кортикостерона.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании успешно проведена валидация набора EIA-4164 (DRG International Inc., США) для неинвазивной оценки активности (ГГНО) у двух видов воробьиных птиц – зарянки и садовой славки – путем измерения метаболитов кортикостерона в помете. Ключевым моментом работы является использование двух модельных видов птиц и прямое сравнение двух способов выражения результатов: концентрации метаболитов кортикостерона (нг/г) и абсолютного количества метаболитов (нг), выделенного за фиксированный интервал времени (3 ч), – в контексте их способности отражать динамику активности ГГНО после фармакологической стимуляции (АКТГ-тест). Кроме того, мы напрямую подтвердили эффективность АКТГ-теста на основе измерения концентрации кортикостерона в плазме крови через час после инъекции. Увеличение концентрации кортикостерона действительно приводило к увеличению количества детектируемых используемым набором метаболитов ГК в помете. Наши результаты также демонстрируют, что выражение данных в виде абсолютного

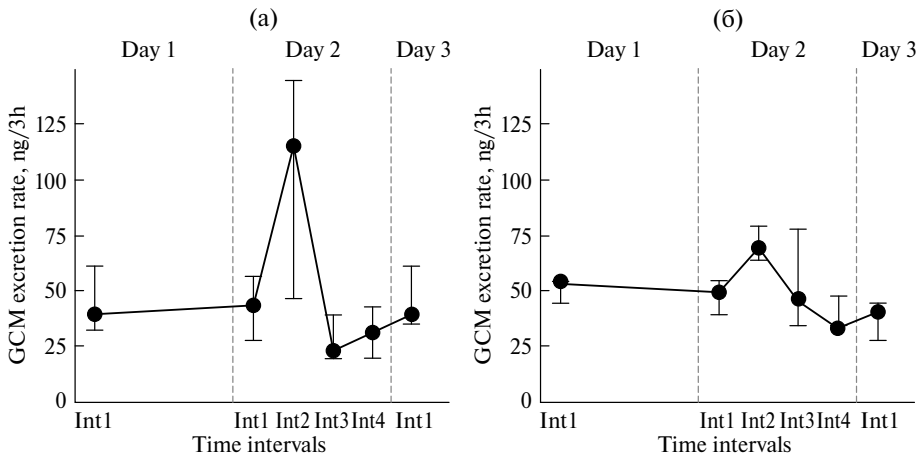


Рис. 6. Динамика количества метаболитов кортикостерона (нг), выделенного с пометом в течение 3-часовых интервалов: (а) – зарянки и (б) – садовые славки. Показаны медианы и межквартильный размах

Fig. 6. The rate of corticosterone metabolite excretion (in ng per 3 hours) during the experiment in (a) European Robins and (b) Garden Warblers. Data are presented as median values and interquartile range

Таблица 2. Результаты смешанной линейной модели, тестирующей различия в количестве метаболитов кортикостерона (нг, данные логарифмированы), выделившихся в течение первого 3-часового интервала второго дня эксперимента (перед введением АКТГ) и в течение остальных 3-часовых интервалов

Table 2. Results of a linear mixed-effects model testing differences in the corticosterone metabolite excretion rate (ng per 3 hour, log-transformed) during the first 3-hour interval on day 2 of the experiment (pre-ACTH injection) and the remaining 3-hour intervals

Фактор (временной интервал)	Зарянка				Садовая славка			
	Коэф.	SE	t	p	Коэф.	SE	t	p
(Intercept)*	1,58	0,11	14,68	<0,001	1,61	0,10	16,19	<0,001
День 2, инт. 2**	0,31	0,15	2,03	0,04	0,20	0,14	1,45	0,15
День 2, инт. 3	-0,14	0,15	-0,95	0,35	0,11	0,14	0,81	0,43
День 2, инт. 4	-0,05	0,15	-0,36	0,72	-0,04	0,14	-0,32	0,75
День 3, инт. 1	0,08	0,15	0,55	0,59	-0,05	0,14	-0,40	0,69
День 1, инт. 1	0,01	0,15	0,09	0,93	0,04	0,14	0,31	0,76
Случайный фактор (SD)								
ID	0,00				0,06			
Residual	0,28				0,21			

*Отражает количество метаболитов кортикостерона, выделившихся за 3 ч в День 2, инт. 1, т.е. перед введением АКТГ

**Интервал, следующий за введением АКТГ.

*Reflects the amount of corticosterone metabolites excreted over 3 hours on Day 2, int. 1, i.e. pre-ACTH injection interval.

** Post-ACTH injection interval.

количества метаболитов кортикостерона устраняет артефакты, связанные с вариацией объема выделенного помета, и обеспечивает биологически корректную интерпретацию активности ГГНО.

Использование концентрации метаболитов выявило существенные различия в абсолютных значениях этого параметра между видами, хотя оба вида показали четкий пик экскреции метаболитов кортикостерона в течение трех часов после инъекции АКТГ. Увеличение концентрации метаболитов кортикостерона, наблюдаемое в нашем исследовании (зарянка – на 284%, садовая славка – на 160% относительно базового уровня перед инъекцией АКТГ), находилось в пределах, обнаруженных в других работах с применением фармакологической стимуляции (от 53 до 2300%, медиана 204% (IQR 366%), $n = 33$ АКТГ-тестов, табл. 3). Стоит отметить, что использование антител к кортизолу приводит в среднем к большему увеличению детектируемых метаболитов кортикостерона в помете (медиана 1000% (IQR 643%), $n = 8$), хотя в случаях сравнения разных антител наибольшую эффективность могут демонстрировать антитела и к другим метаболитам (табл. 3). Также было обнаружено, что через 6 ч после инъекции АКТГ у зарянки концентрация метаболитов снижалась ниже базового уровня, в то же время у садовой славки в этот временной интервал все еще наблюдались повышенные концентрации метаболитов. Как и в некоторых других исследованиях [22, 37], у обоих видов мы обнаружили отрицательную корреляцию между концентрацией метаболитов кортикостерона в помете и массой помета. Это означает, что в те интервалы, когда птицы выделяли наименьшее количество помета, концентрации метаболитов кортикостерона были выше (рис. 5). Данное наблюдение имеет принципиальное значение: изменения концентрации метаболитов кортикостерона могут быть обусловлены не только реальными сдвигами в активности ГГНО и экскреции гормональных метаболитов, но и вариациями в объеме содержимого кишечника (например, из-за изменений в потреблении корма или скорости кишечного транзита) [21, 22, 37, 45]. Наши манипуляции (взятие крови, инъекция АКТГ) достоверно снижали количество съеденного корма и выделяемого помета у зарянки и в виде тенденции у садовой славки, что само по себе могло способствовать регистрации повышенной концентрации метаболитов кортикостерона. Таким образом, интерпретация активности ГГНО исключительно на основе концентрации метаболитов (нг/г) в отдельных случаях может приводить к некорректным заключениям, особенно при сравнении групп животных, различающихся по диете, скорости пищеварения, уровню расхода энергии или другим параметрам [21, 46, 47]. В то же время Goymann [21] подчеркивает, что влияние вышеперечисленных факторов практически не исследовано у крупных животных, для которых использование концентрации метаболитов ГК часто является единственно возможным индикатором активности ГГНО.

Выражение результатов в виде общего количества метаболитов кортикостерона, выделенного за 3 ч (нг), позволило получить более обоснованную картину динамики экскреции метаболитов кортикостерона в ответ на инъекцию АКТГ у модельных видов воробьиных птиц. Абсолютное количество отражает суммарную экскрецию метаболитов за определенный период времени и является более прямым индикатором интегральной активности ГГНО [20–22, 45]. Динамика количества метаболитов кортикостерона показала сходную картину у двух видов птиц: значительное увеличение в первые 3 ч после инъекции АКТГ с последующим снижением до базового уровня. Количество метаболитов увеличилось на 169% для зарянки и на

42% для садовой славки относительно базового уровня перед инъекцией АКТГ, что является первым количественным описанием подобного рода, т.к. в предыдущих работах приведены только изменения концентрации. Интересно, что несмотря на значительные различия в базовой концентрации кортикостерона в плазме (зарянка: 1,7 (IQR 1,6) нг/мл; садовая славка: 19,0 (IQR 2,2) нг/мл) и обратное соотношение концентраций метаболитов в помете (зарянка: 448,1 (IQR 410,1) нг/г; садовая славка: 198,1 (IQR 129,6) нг/г), среднее абсолютное количество метаболитов кортикостерона, выделяемое за 3 часа, оказалось практически идентичным у этих двух близких по размеру видов (зарянка: 37,4 (IQR 35,5) нг; садовая славка: 46,2 (IQR 22,5) нг). Данный результат может отражать сходную скорость метаболизма и экскреции кортикостерона у двух видов, что может напрямую не зависеть от концентрации этого гормона в плазме крови. Однако наиболее вероятно это связано с отличиями в химической структуре метаболитов кортикостерона у зарянки и садовой славки и разной кросс-реактивностью антител в используемом наборе реактивов к этим метаболитам. Это может случайным образом приводить к сходному уровню экскреции метаболитов кортикостерона у разных видов, что затрудняет межвидовые сравнения на основе абсолютных значений количества метаболитов кортикостерона [22–24].

Наши данные подтверждают, что пик экскреции метаболитов кортикостерона у мелких воробьиных птиц приходится преимущественно на первые 3 ч после стимуляции АКТГ, что согласуется с данными для других видов [26, 31, 48], но значительно быстрее по сравнению с аналогичными данными для мелких грызунов, у которых пик экскреции наблюдался через 4–9 ч после АКТГ-теста [19, 24, 49, 50]. Обнаруженный временной лаг от инъекции АКТГ или любого другого воздействия, приводящего к увеличению концентрации кортикостерона в плазме крови, до пика экскреции метаболитов кортикостерона (около 3 ч), соответствует данным о скорости прохождения пищи через кишечный тракт у мелких птиц [22, 23]. Однако индивидуальный анализ показал, что у части птиц (двух зарянок и одной садовой славки) пик экскреции метаболитов кортикостерона наблюдался позже (через 6–9 ч), две зарянки имели повторный небольшой пик на следующий день после введения АКТГ. Такая вариация может быть связана с индивидуальными особенностями метаболизма кортикостерона, кратковременным снижением количества съеденного корма в ответ на взятие проб крови и введение АКТГ, временем нахождения пищи в кишечнике или чувствительностью к АКТГ [22, 51]. Предположительно, отложенные пики экскреции метаболитов в наших экспериментах связаны с кратковременным прекращением кормежки в ответ на двукратный забор крови и инъекцию АКТГ у отдельных птиц.

Интересным различием между видами стало достаточно резкое падение количества метаболитов кортикостерона у зарянок ниже базового уровня через 6 ч после инъекции, что было не так выражено у садовых славок (рис. 6). Это может указывать на более эффективную отрицательную обратную связь в системе ГГНО у зарянок, приводящую к временному подавлению базальной секреции кортикостерона после сильного стрессового ответа [1, 52]. У садовых славок уровень метаболитов кортикостерона после пика снижался до базовых значений позже, что может свидетельствовать о менее выраженном или более пролонгированном торможении ГГНО. Эти различия требуют дальнейшего изучения в контексте экологии и физиологии годового цикла данных видов.

Таблица 3. Выбранные исследования, в которых приводится величина увеличения концентрации метаболитов кортикостерона в помете птиц в ответ на физиологический (АКТГ-тест) или биологические стимулы. Большинство работ выполнено методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием антител к кортикостерону или разным метаболитам глюкокортикоидов

Table 3. Selected studies reporting increases in fecal glucocorticoid metabolite concentrations after physiological (ACTH-test) or biological activation of HPA-axis. Most studies used enzyme immunoassays (EIA) with antibodies against corticosterone or various glucocorticoid metabolites

Вид	Антитела к какому ГК или метаболиту использовали ¹	Стимул, использованный для увеличения активности ГНО	Величина ответа, %	Источник
<i>Saxicola torquata</i>	Кортикостерон	АКТГ-тест	200 ³	[26]
<i>Parus major</i>	11-оксоэтиохолонолон	Агрессивные взаимодействия с конспецификами	37 ³	[34]
<i>Gallus gallus domesticus</i>	Кортикостерон	АКТГ-тест	500	[30]
<i>Zenaida macroura</i>	Кортикостерон²	АКТГ-тест	142 ³	[53]
<i>Spiza americana</i>	Кортикостерон²	Установка радиопередатчика	140 ³	[54]
<i>Gallus gallus domesticus</i>	Кортикостерон Кортизон Тетрагидрокортикостерон	АКТГ-тест	Данные не приведены 844/662 (самцы/самки) Данные не приведены	[55] [55] [55]
<i>Tetrao tetrix</i>	Кортизон 11-оксоэтиохолонолон 20β-дигидрокортикостерон	АКТГ-тест	1200 Данные не приведены Данные не приведены	[56] [56] [56]
<i>Tetrao urogallus</i>	Кортизон 11-оксоэтиохолонолон	АКТГ-тест	2300 ³ Данные не приведены	[57] [57]
<i>Tetrao tetrix</i>	Кортизон	Антропогенное беспокойство	20–60	[15]
<i>Sturnus vulgaris</i>	Кортикостерон²	АКТГ-тест	400 ³	[28]
<i>Chen caerulescens</i>	Кортикостерон²	АКТГ-тест	780 ³	[58]

Таблица 3. Продолжение
Table 3. Continued

Вид	Антигела к какому ГК или метаболиту использовали ¹	Стимул, использованный для увеличения активности ПНО	Величина ответа, %	Источник
<i>Cyanistes caeruleus</i>	Кортизон	Отлов и перемещение в индивидуальную клетку	120	[59]
<i>Gallus gallus domesticus</i>	Кортизон	АКТГ-тест	1500	[59]
<i>Coturnix japonica</i>	Кортизон	АКТГ-тест	300	[59]
<i>Melospittacus undulatus</i>	Кортикостерон²	АКТГ-тест	204 ³	[60]
<i>Oenanthe oenanthe</i>	Кортизон	АКТГ-тест	170 ³	[31]
<i>Alle alle</i>	11-оксэтиохололол Тетрагидрокортикостерон 5 α -прегнан-3 β ,11 β ,21-триол 20-ОН	АКТГ-тест	654/146 (взрослые/птены) 211 ³ (взрослые) 467 ³ (взрослые)	[61] [61] [61]
<i>Amazona aestiva</i>	Кортизон	АКТГ-тест	1210	[62]
<i>Eudrytila minor</i>	Кортизон	Отлов, осмотр, перемещение в новый вольер	520	[63]
<i>Turdoides bicolor</i>	11-оксэтиохололол 5 α -прегнан-3 β ,11 β ,21-триол 20-ОН Тетрагидрокортикостерон Кортикостерон 11-оксэтиохололол Тетрагидрокортикостерон	АКТГ-тест	168/175 ³ (тест / вся выборка ⁴) 112 (тест ⁴) 159/120 ³ (тест / вся выборка ⁴) 105 (тест ⁴) 240 ³ (вся выборка ⁴) 140 ³ (вся выборка ⁴)	[64] [64] [64] [64] [64] [64]
<i>Guaruba guarouba</i>	Кортизон	АКТГ-тест	800	[65]

Таблица 3. Окончание
Table 3. The end

Вид	Антигела к какому ГК или метаболиту использовали ¹	Стимул, использованный для увеличения активности ПТНО	Величина ответа, %	Источник
<i>Ploceus mahali</i>	Кортикостерон	АКТГ-тест	86 (тест ⁴)	[35]
	Тетрагидрокортикостерон 11-оксэтиохолонол 5α-прегнан-3β,11β,21-триол 20-ОН		388/433 (тест / вся выборка ⁴) 103/284 (тест / вся выборка ⁴) 53 (тест ⁴) 56.8 (тест ⁴) 58.6 (тест ⁴) 101 (тест ⁴) 196/235 (тест / вся выборка ⁴)	[35] [35] [35] [35] [35] [35] [35]
<i>Spilopelta capensis</i>	Кортикостерон	АКТГ-тест		
	Тетрагидрокортикостерон 11-оксэтиохолонол 5α-прегнан-3β,11β,21-триол 20-ОН			
<i>Buteo buteo</i>	Кортизон 11-оксэтиохолонол	Отлов, осмотр, забор крови, рентген	529	[32]
	5α-прегнан-3β,11β,21-триол 20-ОН		Данные не приведены Данные не приведены	[32] [32]
<i>Onychognathus morio</i>	Кортикостерон	АКТГ-тест	134 (тест ⁴)	[33]
	5α-прегнан-3β,11β,21-триол 20-ОН		170 (тест ⁴) 258 (тест ⁴) 310/398 (тест / вся выборка ⁴)	[33] [33] [33]
	11-оксэтиохолонол			[33]

¹В случае тестирования антигел к нескольким метаболитам жирным курсивом выделен наиболее чувствительный метод, для которого приводится процент увеличения концентрации метаболитов кортикостерона.

²Анализ проводили радиоиммунным методом.

³В цитируемой работе не приводится точная величина ответа, рассчитано на основании графика.

⁴Тест — разные ИФА были протестированы на части образцов; вся выборка — все образцы были проанализирована с помощью выбранного метода ИФА.

¹When testing antibodies against multiple metabolites, the most sensitive method is shown in bold italics, for which the percentage increase in corticosterone metabolite concentrations is given.

²The analysis was performed using a radioimmunoassay (RIA).

³The cited paper does not provide the exact response value, it was estimated from a graph.

⁴Test — different EIAs were tested on a subset of samples; full sample — all samples were analyzed using the selected ELISA method.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящего исследования подтверждают валидность набора EIA-4164 (DRG International Inc., США) для неинвазивной оценки активности ГГНО у двух видов мигрирующих воробьиных птиц на основании определения метаболитов кортикостерона в помете. Динамика уровня метаболитов кортикостерона в помете птиц адекватно отражает увеличение уровня кортикостерона в плазме крови в ответ на АКГГ-тест у изучаемых видов. Для ситуаций как в природе, так и в лаборатории, когда интенсивность кормления может сильно меняться, мы показали преимущества использования абсолютного количества метаболитов кортикостерона (нг), выделенного за определенный интервал времени, по сравнению с их концентрацией (нг/г). Поэтому в экофизиологических исследованиях, особенно на мелких видах, для оценки активности ГГНО желательно оценивать массу помета, выделенного за фиксированный промежуток времени, и для интерпретации результатов использовать абсолютное количество метаболитов кортикостерона [22, 37]. Очевидно, это условие трудновыполнимо для крупных видов, а также во многих полевых исследованиях, особенно вдали от лабораторий. В этих случаях следует учитывать возможное влияние динамики потребления пищи, диеты и метаболизма животного на интерпретацию функционального значения вариации концентрации метаболитов в помете [21]. Наконец, следует отметить возрастающее применение методов неинвазивного определения гормонального статуса животных при мониторинге состояния популяций редких и исчезающих видов, а также при изучении антропогенного воздействия на животных [15–17]. Однако сильная вариация концентрации метаболитов в зависимости от используемых в ИФА антител не позволяет напрямую сравнивать результаты, полученные в разных исследованиях, и подчеркивает необходимость тщательного выбора способа измерения концентрации метаболитов в помете.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Romero L.M., Wingfield J.C. *Tempests, Poxes, Predators, and People: Stress in Wild Animals and How They Cope*. Oxford; New York: Oxford University Press, 2016.
2. Montesana L., Hau M. Glucocorticoids in a warming world: Do they help birds to cope with high environmental temperatures? *Horm. Behav.* 2022. Vol. 142. 105178. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2022.105178>
3. Taff C.C., Baldan D., Montesana L. et al. Endocrine flexibility can facilitate or constrain the ability to cope with global change. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2024. Vol. 379. 20220502. <https://doi.org/10.1098/rstb.2022.0502>
4. Sapolsky R.M., Romero L.M., Munck A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 2000. Vol. 21. No. 1. Pp. 55–89. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.1.0389>
5. Шпаков А.О. Новые перспективы в изучении гипоталамо-гипофизарной системы. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2020. Т. 106. № 6. С. 665–666. <https://doi.org/10.31857/S0869813920060114>
6. Harvey S., Phillips J.G., Rees A., Hall T.R. Stress and adrenal function. *J. Exp. Biol.* 1984. Vol. 232. Pp. 633–645. <https://doi.org/10.1002/jez.1402320332>

7. Timmermans S., Souffriau J., Libert C. A General Introduction to Glucocorticoid Biology. *Front. Immunol.* 2019. Vol. 10. 1545. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01545>
8. Landys M.M., Ramenofsky M., Wingfield J.C. Actions of glucocorticoids at a seasonal baseline as compared to stress-related levels in the regulation of periodic life processes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2006. Vol. 148. Pp. 132–149. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.02.013>
9. Wingfield J.C., Sapolsky R.M. Reproduction and resistance to stress: when and how. *J. Neuroendocrinol.* 2003. Vol. 15. Pp. 711–724. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01033.x>
10. Haase C.G., Long A.K., Gillooly J.F. Energetics of stress: linking plasma cortisol levels to metabolic rate in mammals. *Biol. Lett.* 2016. Vol. 12. 20150867. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2015.0867>
11. MacDougall-Shackleton S.A., Bonier F., Romero L.M., Moore I.T. Glucocorticoids and “stress” are not synonymous. *Integr. Org. Biol.* 2019. Vol. 1. obz017. <https://doi.org/10.1093/iob/obz017>
12. Jimeno B., Verhulst S. Do glucocorticoids indicate stress? Meta-analysis reveals a tight association between glucocorticoids and metabolic rate. *eLife* 2023. Vol. 12. RP88205. <https://doi.org/10.7554/eLife.88205>
13. Romero L.M., Reed J.M. Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough? *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2005. Vol. 140. Pp. 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.11.004>
14. Vahl T.P., Ulrich-Lai Y.M., Ostrander M.M. et al. Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2005. Vol. 289. Pp. E823–E828. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00122.2005>
15. Arlettaz R., Patthey P., Baltic M. et al. Spreading free-riding snow sports represent a novel serious threat for wildlife. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2007. Vol. 274. Pp. 1219–1224. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.0434>
16. Thiel D., Jenni-Eiermann S., Palme R., Jenni L. Winter tourism increases stress hormone levels in the Capercaillie *Tetrao urogallus*. *Ibis* 2011. Vol. 153. Pp. 122–133. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2010.01083.x>
17. Naidenko S.V., Berezhnoi M.A., Kumar V., Umaphathy G. Comparison of tigers’ fecal glucocorticoids level in two extreme habitats. *PLoS One* 2019. Vol. 14. e0214447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214447>
18. Павлова Е.В., Найденко С.В. Неинвазивный мониторинг глюкокортикоидов в экскрементах дальневосточного лесного кота (*Prionailurus bengalensis euptilurus*). *Зоологический журнал*. 2008. Т. 87. С. 1375–1381.
19. Суркова Е.Н., Савинецкая Л.Е., Чабовский А.В. Валидация метода определения метаболитов глюкокортикоидов в экскрементах полуденной песчанки (*Meriones meridianus* Pallas 1773, Muridae, Rodentia): биологический и физиологический подходы. *Зоологический журнал*. 2023. Т. 102. № 9. С. 1072–1080. <https://doi.org/10.31857/S004451342309012X>
20. Goymann W. Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings: physiological validation, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005. Vol. 1046. Pp. 35–53. <https://doi.org/10.1196/annals.1343.005>

21. Goymann W. On the use of non-invasive hormone research in uncontrolled, natural environments: the problem with sex, diet, metabolic rate and the individual: Non-invasive hormone research. *Methods Ecol. Evol.* 2012. Vol. 3. Pp. 757–765. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00203.x>
22. Palme R. Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. *Physiol. Behav.* 2019. Vol. 199. Pp. 229–243. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.11.021>
23. Möstl E., Rettenbacher S., Palme R. Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: an analytical approach. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005. Vol. 1046. Pp. 17–34. <https://doi.org/10.1196/annals.1343.004>
24. Rowland N.E., Toth L.A. Analytic and interpretational pitfalls to measuring fecal corticosterone metabolites in laboratory rats and mice. *Comp. Med.* 2019. Vol. 69. Pp. 337–349. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-18-000119>
25. Touma C., Palme R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005. Vol. 1046. Pp. 54–74. <https://doi.org/10.1196/annals.1343.006>
26. Goymann W., Möstl E., Gwinner E. Corticosterone metabolites can be measured noninvasively in excreta of European stonechats (*Saxicola torquata rubicola*). *The Auk.* 2002. Vol. 119. 1167. [https://doi.org/10.1642/0004-8038\(2002\)119%5B1167:CMCBMN%5D2.0.CO;2](https://doi.org/10.1642/0004-8038(2002)119%5B1167:CMCBMN%5D2.0.CO;2)
27. Palme R., Rettenbacher S., Touma C. et al. Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005. Vol. 1040. Pp. 162–171. <https://doi.org/10.1196/annals.1327.021>
28. Cyr N.E., Romero L.M. Fecal glucocorticoid metabolites of experimentally stressed captive and free-living starlings: implications for conservation research. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2008. Vol. 158. Pp. 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.05.001>
29. Herring G., Gawlik D.E. Stability of avian fecal corticosterone metabolite levels in frozen avian feces. *J. Wildl. Manag.* 2009. Vol. 73. Pp. 1010–1013. <https://doi.org/10.2193/2008-398>
30. Dehnhard M., Schreer A., Krone O. et al. Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*), and the goshawk (*Accipiter gentilis*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 2003. Vol. 131. Pp. 345–352. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00033-9](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00033-9)
31. Eikenaar C., Bairlein F., Stöwe M. et al. Corticosterone, food intake and refueling in a long-distance migrant. *Horm. Behav.* 2014. Vol. 65. Pp. 480–487. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.03.015>
32. Grundei L-L., Wolf T.E., Brandes F. et al. Validation of fecal glucocorticoid metabolites as non-invasive markers for monitoring stress in Common Buzzards (*Buteo buteo*). *Animals.* 2024. Vol. 14. No. 8. 1234. <https://doi.org/10.3390/ani14081234>
33. Nhlapo K.B., Cunningham S.J., Sumasgutner P. et al. High human presence is correlated with lower faecal glucocorticoid metabolite levels in an urban bird population. *Horm. Behav.* 2025. Vol. 170. 105724. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2025.105724>
34. Carere C., Groothuis T.G.G., Möstl E. et al. Fecal corticosteroids in a territorial bird selected for different personalities: daily rhythm and the response to social stress. *Horm. Behav.* 2003. Vol. 43. Pp. 540–548. [https://doi.org/10.1016/S0018-506X\(03\)00065-5](https://doi.org/10.1016/S0018-506X(03)00065-5)

35. Ngcamphalala C.A., Nicolson S.W., Ganswindt A. et al. Physiological validation of the use of faecal glucocorticoid metabolites as a measure of stress in a passerine and a columbid from southern Africa. *Emu – Austral. Ornithol.* 2023. Vol. 123. No. 1. Pp. 79–84. <https://doi.org/10.1080/01584197.2022.2158476>
36. Palme R., Touma C., Arias N. et al. Steroid extraction: Get the best out of faecal samples. *Wien Tierärztl Monatschr.* 2013. Vol. 100. Pp. 238–246.
37. Goymann W., Trappschuh M., Jensen W. et al. Low ambient temperature increases food intake and dropping production, leading to incorrect estimates of hormone metabolite concentrations in European stonechats. *Horm. Behav.* 2006. Vol. 49. Pp. 644–653. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.12.006>
38. Bairlein F. How to get fat: nutritional mechanisms of seasonal fat accumulation in migratory songbirds. *Naturwissenschaften.* 2002. Vol. 89. Pp. 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00114-001-0279-6>
39. Bauchinger U., Hof T.V., Biebach H. Testicular development during long-distance spring migration. *Horm. Behav.* 2007. Vol. 51. Pp. 295–305. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2006.10.010>
40. Loshchagina J., Tsvey A., Naidenko S. Baseline and stress-induced corticosterone levels are higher during spring than autumn migration in European robins. *Horm. Behav.* 2018. Vol. 98. Pp. 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.12.013>
41. Loshchagina J., Naidenko S., Tsvey A. Corticosterone unlikely indicates departure readiness in migratory European robins. *Horm. Behav.* 2025. Vol. 173. 105764. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2025.105764>
42. Tsvey A., Loshchagina J., Naidenko S. Migratory species show distinct patterns in corticosterone levels during spring and autumn migrations. *Anim. Migr.* 2019. Vol. 6. Pp. 4–18. <https://doi.org/10.1515/ami-2019-0003>
43. Bates D., Mächler M., Bolker B. et al. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J. Stat. Softw.* 2015. Vol. 67. Pp. 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
44. Kuznetsova A., Brockhoff P.B., Christensen R.H.B. lmerTest package: tests in linear mixed effects models. *J. Stat. Softw.* 2017. Vol. 82. Pp. 1–26. <https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13>
45. Hayward L.S., Booth R.K., Wasser S.K. Eliminating the artificial effect of sample mass on avian fecal hormone metabolite concentration. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2010. Vol. 169. Pp. 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.08.004>
46. Millspaugh J.J., Washburn B.E. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2004. Vol. 138. Pp. 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.07.002>
47. Pellegrini S., Busso J.M., Lèche A. et al. Effects of diet, time since defecation, and drying process of the droppings on corticosterone metabolite measurements in Japanese quail. *Poult. Sci.* 2015. Vol. 94. Pp. 1068–1074. <https://doi.org/10.3382/ps/pev072>
48. Fletcher K., Xiong Y., Fletcher E. et al. Glucocorticoid response to both predictable and unpredictable challenges detected as corticosterone metabolites in collared flycatcher droppings. *PLoS One.* 2018. Vol. 13. e0209289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209289>

49. Rogovin K.A., Naidenko S.V. Noninvasive assessment of stress in bank voles (*Myodes glareolus*, Cricetidae, Rodentia) by means of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Biol. Bull.* 2010. Vol. 37. Pp. 959–964. <https://doi.org/10.1134/S1062359010090098>
50. Navarro-Castilla Á., Garrido M., Hawlena H. et al. Non-Invasive monitoring of adrenocortical activity in three sympatric desert gerbil species. *Animals*. 2021. Vol. 11. No. 1. 75. <https://doi.org/10.3390/ani11010075>
51. Touma C., Palme R., Sachser N. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Horm. Behav.* 2004. Vol. 45. Pp. 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2003.07.002>
52. Lattin C.R., Kelly T.R. Glucocorticoid negative feedback as a potential mediator of trade-offs between reproduction and survival. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2020. Vol. 286. 113301. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113301>
53. Washburn B.E., Millspaugh J.J., Schulz J.H. et al. Using fecal glucocorticoids for stress assessment in mourning doves. *Condor*. 2003. Vol. 105. Pp. 696–706.
54. Suedkamp Wells K.M., Washburn B.E., Millspaugh J.J. et al. Effects of radio-transmitters on fecal glucocorticoid levels in captive Dickcissels. *Condor*. 2003. Vol. 105. Pp. 805–810.
55. Rettenbacher S., Möstl E., Hackl R. et al. Measurement of corticosterone metabolites in chicken droppings. *Br. Poult. Sci.* 2004. Vol. 45. Pp. 704–711. <https://doi.org/10.1080/00071660400006156>
56. Baltic M., Jenni-Eiermann S., Arlettaz R. et al. A noninvasive technique to evaluate human-generated stress in the black grouse. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005. Vol. 1046. Pp. 81–95. <https://doi.org/10.1196/annals.1343.008>
57. Thiel D., Jenni-Eiermann S., Palme R. Measuring corticosterone metabolites in droppings of Capercaillies (*Tetrao urogallus*). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005. Vol. 1046. Pp. 96–108. <https://doi.org/10.1196/annals.1343.009>
58. Legagneux P., Gauthier G., Chastel O., Picard G., Bêty J. Do glucocorticoids in droppings reflect baseline level in birds captured in the wild? A case study in snow geese. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2011. Vol. 172. Pp. 440–445. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.04.009>
59. Stöwe M., Rettenbacher S., Busso J.M. et al. Patterns of excreted glucocorticoid metabolites change during development – analytical and physiological implications. *Wien. Tierärztl. Monatsschrift.* 2013. Vol. 100. Pp. 271–282.
60. Young A.M., Hallford D.M. Validation of a fecal glucocorticoid metabolite assay to assess stress in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). *Zoo Biol.* 2013. Vol. 32. Pp. 112–116. <https://doi.org/10.1002/zoo.21041>
61. Kidawa D., Wojczulanis-Jakubas K., Jakubas D. et al. Variation in faecal corticosterone metabolites in an Arctic seabird, the Little Auk (*Alle alle*) during the nesting period. *Polar Biol.* 2014. Vol. 37. Pp. 641–649. <https://doi.org/10.1007/s00300-014-1464-3>
62. Ferreira J.C.P., Fujihara C.J., Fruhvald E. et al. Non-invasive measurement of adrenocortical activity in blue-fronted parrots (*Amazona aestiva*, Linnaeus, 1758). *PLoS One*. 2015. Vol. 10. e0145909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145909>

63. Sherwen S.L., Fanson K.V. Validation of an assay to measure glucocorticoid metabolites in the droppings of little penguins (*Eudyptula minor*). *J. Zoo Aquar. Res.* 2015. Vol. 3. Pp. 134–136.
64. Jepsen E.M., Ganswindt A., Ngcamphalala C.A. et al. Non-invasive monitoring of physiological stress in an afrotropical arid-zone passerine bird, the southern pied babbler. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2019. Vol. 276. Pp. 60–68.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.03.002>
65. Sinhorini J.A., Pizzutto C.S., Palme R. ACTH stimulation induced self-mutilation behavior in the golden conure (*Guaruba guarouba*). *Animals.* 2020. Vol. 10. No. 3. 418.
<https://doi.org/10.3390/ani10030418>

REFERENCES

1. Romero L.M., Wingfield J.C. *Tempests, Poxes, Predators, and People: Stress in Wild Animals and How They Cope*. Oxford; New York: Oxford University Press; 2016.
2. Montesana L., Hau M. Glucocorticoids in a warming world: Do they help birds to cope with high environmental temperatures? *Horm. Behav.* 2022;**142**:105178.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2022.105178>
3. Taff C.C., Baldan D., Montesana L. et al. Endocrine flexibility can facilitate or constrain the ability to cope with global change. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2024;**379**:20220502. <https://doi.org/10.1098/rstb.2022.0502>
4. Sapolsky R.M., Romero L.M., Munck A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 2000;**21**(1):55–89. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.1.0389>
5. Shpakov A.O. Novyye perspektivy v izuchenii gipotalamo gipofizarnoy sistemy [New perspectives in the study of the hypothalamic-pituitary system]. *Rossiyskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova = Russ. J. Physiol.* 2020;**106**(6):665–666. (In Russ.)
<https://doi.org/10.31857/S0869813920060114>
6. Harvey S., Phillips J.G., Rees A., Hall T.R. Stress and adrenal function. *J. Exp. Biol.* 1984;**232**:633–645. <https://doi.org/10.1002/jez.1402320332>
7. Timmermans S., Souffriau J., Libert C. A General Introduction to Glucocorticoid Biology. *Front. Immunol.* 2019;**10**:1545. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01545>
8. Landys M.M., Ramenofsky M., Wingfield J.C. Actions of glucocorticoids at a seasonal baseline as compared to stress-related levels in the regulation of periodic life processes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2006;**148**:132–149.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.02.013>
9. Wingfield J.C., Sapolsky R.M. Reproduction and resistance to stress: when and how. *J. Neuroendocrinol.* 2003;**15**:711–724.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01033.x>
10. Haase C.G., Long A.K., Gillooly J.F. Energetics of stress: linking plasma cortisol levels to metabolic rate in mammals. *Biol. Lett.* 2016;**12**:20150867.
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2015.0867>
11. MacDougall-Shackleton S.A., Bonier F., Romero L.M., Moore I.T. Glucocorticoids and “stress” are not synonymous. *Integr. Org. Biol.* 2019;**1**:obz017.
<https://doi.org/10.1093/iob/obz017>

12. Jimeno B., Verhulst S. Do glucocorticoids indicate stress? Meta-analysis reveals a tight association between glucocorticoids and metabolic rate. *eLife*. 2023;**12**:RP88205. <https://doi.org/10.7554/eLife.88205>
13. Romero L.M., Reed J.M. Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough? *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2005;**140**:73–79. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.11.004>
14. Vahl T.P., Ulrich-Lai Y.M., Ostrander M.M. et al. Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2005;**289**:E823–E828. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00122.2005>
15. Arlettaz R., Patthey P., Baltic M. et al. Spreading free-riding snow sports represent a novel serious threat for wildlife. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2007;**274**:1219–1224. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.0434>
16. Thiel D., Jenni-Eiermann S., Palme R., Jenni L. Winter tourism increases stress hormone levels in the Capercaillie *Tetrao urogallus*. *Ibis*. 2011;**153**:122–133. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2010.01083.x>
17. Naidenko S.V., Berezhnoi M.A., Kumar V. et al. Comparison of tigers' fecal glucocorticoids level in two extreme habitats. *PLoS One*. 2019;**14**:e0214447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214447>
18. Pavlova E.V., Naidenko S.V. Neinvazivnyy monitoring glyukokortikoidov v ekskrementakh dal'nevostochnogo lesnogo kota (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) [Non-invasive monitoring of glucocorticoids in the feces of the Amur forest cat (*Prionailurus bengalensis euptilurus*)]. *Zoologicheskii zhurnal*. 2008;**87**:1375–1381. (In Russ.)
19. Surkova E.N., Savinetskaya L.E., Chabovskiy A.V. Validatsiya metoda opredeleniya metabolitov glyukokortikoidov v ekskrementakh poludennoy peschanki (*Meriones meridianus* Pallas 1773, Muridae, Rodentia): biologicheskii i fiziologicheskii podkhody [Validation of a method for measuring the fecal glucocorticoid metabolites in the midday gerbil (*Meriones meridianus* Pallas 1773, Muridae, Rodentia): biological and physiological approaches]. *Zoologicheskii zhurnal*. 2023;**102**(9):1072–1080. (In Russ.) <https://doi.org/10.31857/S004451342309012X>
20. Goymann W. Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings: physiological validation, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005;**1046**:35–53. <https://doi.org/10.1196/annals.1343.005>
21. Goymann W. On the use of non-invasive hormone research in uncontrolled, natural environments: the problem with sex, diet, metabolic rate and the individual: Non-invasive hormone research. *Methods Ecol. Evol.* 2012;**3**:757–765. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00203.x>
22. Palme R. Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. *Physiol. Behav.* 2019;**199**:229–243. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.11.021>
23. Möstl E., Rettenbacher S., Palme R. Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: an analytical approach. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005;**1046**:17–34. <https://doi.org/10.1196/annals.1343.004>

24. Rowland N.E., Toth L.A. Analytic and interpretational pitfalls to measuring fecal corticosterone metabolites in laboratory rats and mice. *Comp. Med.* 2019;**69**:337–349. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-18-000119>
25. Touma C., Palme R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005;**1046**:54–74. <https://doi.org/10.1196/annals.1343.006>
26. Goymann W., Möstl E., Gwinner E. Corticosterone metabolites can be measured noninvasively in excreta of European stonechats (*Saxicola torquata rubicola*). *The Auk.* 2002;**119**:1167. [https://doi.org/10.1642/0004-8038\(2002\)119%5B1167:CMCBMN%5D2.0.CO;2](https://doi.org/10.1642/0004-8038(2002)119%5B1167:CMCBMN%5D2.0.CO;2)
27. Palme R., Rettenbacher S., Touma C. et al. Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005;**1040**:162–171. <https://doi.org/10.1196/annals.1327.021>
28. Cyr N.E., Romero L.M. Fecal glucocorticoid metabolites of experimentally stressed captive and free-living starlings: implications for conservation research. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2008;**158**:20–28. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.05.001>
29. Herring G., Gawlik D.E. Stability of avian fecal corticosterone metabolite levels in frozen avian feces. *J. Wildl. Manag.* 2009;**73**:1010–1013. <https://doi.org/10.2193/2008-398>
30. Dehnhard M., Schreer A., Krone O. et al. Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*), and the goshawk (*Accipiter gentilis*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 2003;**131**:345–352. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00033-9](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00033-9)
31. Eikenaar C., Bairlein F., Stöwe M. et al. Corticosterone, food intake and refueling in a long-distance migrant. *Horm. Behav.* 2014;**65**:480–487. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.03.015>
32. Grundei L-L., Wolf T.E., Brandes F. et al. Validation of fecal glucocorticoid metabolites as non-invasive markers for monitoring stress in Common Buzzards (*Buteo buteo*). *Animals.* 2024;**14**(8):1234. <https://doi.org/10.3390/ani14081234>
33. Nhlapo K.B., Cunningham S.J., Sumasgutner P. et al. High human presence is correlated with lower faecal glucocorticoid metabolite levels in an urban bird population. *Horm. Behav.* 2025;**170**:105724. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2025.105724>
34. Carere C., Groothuis T.G.G., Möstl E. et al. Fecal corticosteroids in a territorial bird selected for different personalities: daily rhythm and the response to social stress. *Horm. Behav.* 2003;**43**:540–548. [https://doi.org/10.1016/S0018-506X\(03\)00065-5](https://doi.org/10.1016/S0018-506X(03)00065-5)
35. Ngcamphalala C.A., Nicolson S.W., Ganswindt A. et al. Physiological validation of the use of faecal glucocorticoid metabolites as a measure of stress in a passerine and a columbid from southern Africa. *Emu – Austral. Ornithol.* 2023;**123**(1):79–84. <https://doi.org/10.1080/01584197.2022.2158476>
36. Palme R., Touma C., Arias N. et al. Steroid extraction: Get the best out of faecal samples. *Wien Tierärztl Monatsschr.* 2013;**100**:238–246.
37. Goymann W., Trappschuh M., Jensen W. et al. Low ambient temperature increases food intake and dropping production, leading to incorrect estimates of hormone metabolite concentrations in European stonechats. *Horm. Behav.* 2006;**49**:644–653. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.12.006>

38. Bairlein F. How to get fat: nutritional mechanisms of seasonal fat accumulation in migratory songbirds. *Naturwissenschaften*. 2002;**89**:1–10. <https://doi.org/10.1007/s00114-001-0279-6>
39. Bauchinger U., Hof T.V., Biebach H. Testicular development during long-distance spring migration. *Horm. Behav.* 2007;**51**:295–305. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2006.10.010>
40. Loshchagina J., Tsvey A., Naidenko S. Baseline and stress-induced corticosterone levels are higher during spring than autumn migration in European robins. *Horm. Behav.* 2018;**98**:96–102. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.12.013>
41. Loshchagina J., Naidenko S., Tsvey A. Corticosterone unlikely indicates departure readiness in migratory European robins. *Horm. Behav.* 2025;**173**:105764. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2025.105764>
42. Tsvey A., Loshchagina J., Naidenko S. Migratory species show distinct patterns in corticosterone levels during spring and autumn migrations. *Anim. Migr.* 2019;**6**:4–18. <https://doi.org/10.1515/ami-2019-0003>
43. Bates D., Mächler M., Bolker B. et al. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J. Stat. Softw.* 2015;**67**:1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
44. Kuznetsova A., Brockhoff P.B., Christensen R.H.B. lmerTest package: tests in linear mixed effects models. *J. Stat. Softw.* 2017;**82**:1–26. <https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13>
45. Hayward L.S., Booth R.K., Wasser S.K. Eliminating the artificial effect of sample mass on avian fecal hormone metabolite concentration. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2010;**169**:117–122. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.08.004>
46. Millspaugh J.J., Washburn B.E. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2004;**138**:189–199. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.07.002>
47. Pellegrini S., Busso J.M., Lèche A. et al. Effects of diet, time since defecation, and drying process of the droppings on corticosterone metabolite measurements in Japanese quail. *Poult. Sci.* 2015;**94**:1068–1074. <https://doi.org/10.3382/ps/pev072>
48. Fletcher K., Xiong Y., Fletcher E. et al. Glucocorticoid response to both predictable and unpredictable challenges detected as corticosterone metabolites in collared flycatcher droppings. *PLoS One*. 2018;**13**:e0209289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209289>
49. Rogovin K.A., Naidenko S.V. Noninvasive assessment of stress in bank voles (*Myodes glareolus*, Cricetidae, Rodentia) by means of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Biol. Bull.* 2010;**37**:959–964. <https://doi.org/10.1134/S1062359010090098>
50. Navarro-Castilla Á., Garrido M., Hawlena H. et al. Non-Invasive monitoring of adrenocortical activity in three sympatric desert gerbil species. *Animals*. 2021;**11**(1):75. <https://doi.org/10.3390/ani11010075>
51. Touma C., Palme R., Sachser N. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Horm. Behav.* 2004;**45**:10–22. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2003.07.002>
52. Lattin C.R., Kelly T.R. Glucocorticoid negative feedback as a potential mediator of trade-offs between reproduction and survival. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2020;**286**:113301. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113301>

53. Washburn B.E., Millspaugh J.J., Schulz J.H. et al. Using fecal glucocorticoids for stress assessment in mourning doves. *Condor*. 2003;**105**:696–706.
54. Suedkamp Wells K.M., Washburn B.E., Millspaugh J.J. et al. Effects of radio-transmitters on fecal glucocorticoid levels in captive Dickcissels. *Condor*. 2003;**105**:805–810.
55. Rettenbacher S., Möstl E., Hackl R. et al. Measurement of corticosterone metabolites in chicken droppings. *Br. Poultry Sci.* 2004;**45**:704–711.
<https://doi.org/10.1080/00071660400006156>
56. Baltic M., Jenni-Eiermann S., Arlettaz R. et al. A noninvasive technique to evaluate human-generated stress in the black grouse. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005;**1046**:81–95.
<https://doi.org/10.1196/annals.1343.008>
57. Thiel D., Jenni-Eiermann S., Palme R. Measuring corticosterone metabolites in droppings of Capercaillies (*Tetrao urogallus*). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005;**1046**:96–108.
<https://doi.org/10.1196/annals.1343.009>
58. Legagneux P., Gauthier G., Chastel O., Picard G., Bêty J. Do glucocorticoids in droppings reflect baseline level in birds captured in the wild? A case study in snow geese. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2011;**172**:440–445.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.04.009>
59. Stöwe M., Rettenbacher S., Busso J.M. et al. Patterns of excreted glucocorticoid metabolites change during development – analytical and physiological implications. *Wien. Tierärztl. Monatsschrift.* 2013;**100**:271–282.
60. Young A.M., Hallford D.M. Validation of a fecal glucocorticoid metabolite assay to assess stress in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). *Zoo Biol.* 2013;**32**:112–116.
<https://doi.org/10.1002/zoo.21041>
61. Kidawa D., Wojczulanis-Jakubas K., Jakubas D. et al. Variation in faecal corticosterone metabolites in an Arctic seabird, the Little Auk (*Alle alle*) during the nesting period. *Polar Biol.* 2014;**37**:641–649. <https://doi.org/10.1007/s00300-014-1464-3>
62. Ferreira J.C.P., Fujihara C.J., Fruhvald E. et al. Non-invasive measurement of adrenocortical activity in blue-fronted parrots (*Amazona aestiva*, Linnaeus, 1758). *PLoS One*. 2015;**10**:e0145909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145909>
63. Sherwen S.L., Fanson K.V. Validation of an assay to measure glucocorticoid metabolites in the droppings of little penguins (*Eudyptula minor*). *J. Zoo Aquar. Res.* 2015;**3**:134–136.
64. Jepsen E.M., Ganswindt A., Ngcamphalala C.A. et al. Non-invasive monitoring of physiological stress in an afro-tropical arid-zone passerine bird, the southern pied babbler. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2019;**276**:60–68.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.03.002>
65. Sinhorini J.A., Pizzutto C.S., Palme R. ACTH stimulation induced self-mutilation behavior in the golden conure (*Guaruba guarouba*). *Animals*. 2020;**10**(3):418.
<https://doi.org/10.3390/ani10030418>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Цвей Арсений Львович – канд. биол. наук; вед. науч. сотр., биологическая станция «Рыбачий», Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Российская Федерация
E-mail: Arseny.Tsvey@zin.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9671-9404>

Лощагина Юлия Александровна – науч. сотр., Институт географии РАН, Москва, Российская Федерация
E-mail: julia.loshchagina@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-8662-0723>

Найденко Сергей Валериевич – д-р биол. наук; гл. науч. сотр., Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Российская Федерация
E-mail: snaidenko@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6400-5108>

Поступила в редакцию 05.09.2025
После доработки 16.01.2026
Принята к публикации 18.01.2026

ABOUT THE AUTHORS

Tsvey, Arseny L. – Cand. Sc. (Biology); Head Scientist Researcher, Biological Station “Rybachy”, Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation
E-mail: Arseny.Tsvey@zin.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9671-9404>

Loshchagina, Yulia A. – Research Officer, Institute of Geography of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
E-mail: julia.loshchagina@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-8662-0723>

Naidenko, Sergey V. – Ph.D. (Biology); Chief Researcher, A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
E-mail: snaidenko@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6400-5108>

Received September 05, 2025
Revised January 16, 2026
Accepted January 18, 2026