

На правах рукописи

Вознесенская Анна Евгеньевна

**РОЛЬ СТРЕССА В РЕГУЛЯЦИИ ВОСПРИЯТИЯ ХИМИЧЕСКИХ
СИГНАЛОВ РЕЦЕПТИВНОЙ САМКИ У ДОМОВОЙ МЫШИ**

03.00.28 – биоинформатика

03.00.13 - физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2009

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук
Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН

Научные руководители: кандидат биологических наук
Минор Александр Викторович
(Учреждение Российской академии наук
Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН)

кандидат биологических наук
Родионова Елена Ивановна
(Учреждение Российской академии наук
Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН)

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Мошкин Михаил Павлович
(Учреждение Российской академии наук
Институт Цитологии и Генетики Сибирского Отделения РАН)

кандидат биологических наук, доцент
Мартьянов Андрей Александрович
(Биологический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова)

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук
Институт биологии гена РАН

Защита диссертации состоится 11 июня 2009 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д002.077.02 при Институте проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН по адресу:
127994, г. Москва, ГСП-4, Большой Каретный переулок, д.19. стр. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН

Автореферат разослан мая 2009 года

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

Рожкова Г.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Последние 15 лет исследований процессов восприятия и анализа информации в обонятельной системе позвоночных вывели данную область биологической науки на качественно новый уровень. Открытие обонятельных рецепторов сделало возможным изучение механизмов рецепции и кодирования информации о химических стимулах в обонятельной системе млекопитающих. Современные исследования указывают на общность механизмов проведения сигнала в обонятельной и других сенсорных системах. Обонятельная система большинства млекопитающих состоит из двух функционально различных отделов: основной обонятельной системы (ООС) и дополнительной обонятельной системы (ДОС). При общности выполняемых функций имеет место некоторая специализация двух обонятельных систем. Имеющиеся на сегодняшний день сведения позволяют говорить о том, что в ходе эволюции ДОС сформировалась как система, специализированная для восприятия и анализа феромонов и функционально близких к ним химических соединений. В настоящее время интенсивно изучаются механизмы регуляции рецепции и проведения сигнала в ООС и ДОС млекопитающих. Эта проблематика вызывает большой интерес научного сообщества, поскольку восприятие и анализ запаховых раздражителей лежит в основе организации социального, в том числе и полового поведения млекопитающих. Большая часть работ посвящена влиянию половых гормонов на восприятие химических сигналов в общем и феромонов в частности у различных видов млекопитающих. Влияние же стресса на рецепцию в обонятельной системе совершенно не изучено. В то же время классическими исследованиями показано подавление репродуктивного поведения самцов различных видов млекопитающих под воздействием стресса. Учитывая вышесказанное и наличие прямых механизмов регуляции полового поведения со стороны обонятельной системы, представляется крайне интересным исследование возможности действия гормонов стресса на рецепцию и проведение сигнала в обонятельной системе млекопитающих. Влияние стресса на восприятие химических сигналов обонятельной системой может быть рассмотрено как один из механизмов контроля репродуктивного поведения в рамках динамической модели естественной регуляции численности популяций.

Цели и задачи исследования.

Целью настоящей работы являлось исследование влияния стресса на информационную значимость обонятельных сигналов в рамках динамической модели регуляции численности популяций. В рамках данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить влияние естественных видов стресса на рецепцию химических сигналов эстральной самки своего вида самцами домовый мыши на уровне рецепторной ткани вомероназального органа (ВНО);
2. Оценить влияние естественных видов стресса на восприятие химических сигналов эстральной самки своего вида самцами домовый мыши на уровне поведения;
3. Исследовать возможные физиологические механизмы, обеспечивающие модуляцию сигнала на уровне рецепторной ткани ВНО.

Научная новизна и практическая значимость.

В рамках настоящей работы впервые исследовано влияние стресса на восприятие химических сигналов эстральной самки самцами домовый мыши на уровне периферического звена ДОС. Впервые показана иммунореактивность к рецептору глюкокортикоидов в рецепторной ткани ВНО. Иммунореактивность к рецептору андрогенов в рецепторной ткани ВНО не была выявлена. Результаты, полученные в данном исследовании, указывают на угнетение ответа рецепторных нейронов ВНО на химические сигналы рецептивной самки под воздействием холодого и эмоционального стресса. Впервые показано, что упомянутые виды стресса подавляют развитие Fos-иммунореактивности в рецепторной ткани ВНО самцов домовый мыши в ответ на предъявление подстилки, содержащей химические сигналы рецептивной самки. Присутствие иммунореактивности к рецептору глюкокортикоидов в рецепторной ткани ВНО позволяет предположить возможность прямого действия гормонов стресса на рецепторные клетки ВНО. Согласно полученным данным, стрессированные самцы домовый мыши не отдают предпочтения запаху эстральной самки по сравнению с запахом самки на стадии диэструса, хотя животные контрольной группы демонстрировали такого рода предпочтение. Таким образом, подавление ответа рецепторных клеток ВНО приводит к угнетению реакций, связанных с половым поведением.

Автором адаптирована методика иммуногистохимического окрашивания срезов нервной ткани на белок Fos для рецепторной ткани ВНО. Правомочность использования адаптированной методики для нейрональной ткани ВНО подтверждена для лабораторных и нескольких видов дикоживущих мышей. Полученные результаты имеют теоретическое значение для понимания тонких механизмов регуляции работы обонятельной системы млекопитающих и их

взаимосвязи с репродуктивным поведением. Знание механизмов регуляции полового поведения грызунов необходимо для обеспечения контроля их численности, требующегося в условиях больших городов и для эффективного ведения сельского хозяйства.

Публикации по теме диссертационной работы

По теме диссертации опубликовано 16 работ.

Апробация работы.

Работа апробирована на межлабораторном семинаре Лаборатории сравнительной нейробиологии позвоночных ИППЭ РАН и Лаборатории обработки сенсорной информации ИППИ РАН 5 марта 2009 года.

Основные результаты были представлены и доложены на следующих международных и отечественных совещаниях: XV International symposium on olfaction and taste (ISOT) 21-26 Июля 2008 г., Сан-Франциско, США; XVIII Congress of European chemoreception research organization (ECRO) 3-7 сентября 2008 г., Порторож, Словения; V European Congress of Mammology, 21-26 Сентября 2007г., Сиена, Италия; XVII Congress of European chemoreception research organization (ECRO) 4-8 сентября 2006 г., Гранада, Испания; International Summer School on Ecological Brain Research III., 31 июля – 5 августа, 2005г., Москва-Бубоницы, Россия; XXIX International Ethological Conference, 20-27 сентября 2005 г., Будапешт, Венгрия; XVI Congress of European chemoreception research organization (ECRO) 20-27 августа 2004 г., Дижон, Франция; Конференция молодых сотрудников и аспирантов ИПЭЭ РАН, посвященная 140-летию А.Н.Северцова. Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых, 5-6 октября 2006г., Москва; 10-я Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века», 17-21 апреля 2006г., Пущино; Териофауна России и сопредельных территорий. VIII Съезд Териологического общества, 31 января - 2 февраля 2007 г., Москва; IV Всероссийская конференция по поведению животных, 29 октября - 1 ноября, 2007г., Москва; Конференция молодых сотрудников и аспирантов Института проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН 10-11 апреля 2008 г., Москва; XII Научная конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности 8-9 октября 2008 г., Москва.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы о методах и материалах, результатов и обсуждения, заключения и списка цитированной литературы. Работа изложена на 103 страницах и содержит 30 рисунков. Список литературы включает в себя 200 наименований, в том числе 193 на иностранных языках.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 07-04-01538).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методы и материалы

В работе были использованы три основных методических подхода, а именно: иммуногистохимию на срезах ОЛ и рецепторной ткани ВНО, иммуноферментный анализ (ИФА) для определения уровня основных стероидных гормонов в плазме крови и поведенческий подход для оценки некоторых параметров полового поведения.

Работа выполнена на мышах гетерогенной лабораторной популяции и мышах линии BALB/C в возрасте от 2-6 мес. Общее количество животных, использованных в работе, составило 190 особей.

Иммуногистохимические методы

Иммуногистохимическое окрашивание срезов ВНО и ОЛ было использовано для выявления иммунореактивности к белку Fos, рецептору андрогенов (AR) и рецептору глюкокортикоидов (GR). Мы использовали непрямой авидин-биотиновый метод, в качестве ферментной метки – пероксидазу хрена, в качестве хромогена - диаминобензидин (ДАБ). Окрашивание тотальных препаратов ВНО (толщина срезов 30 μM) осуществлялось по стандартному трехдневному протоколу с использованием первичных антител производства Santa Cruz Biotechnology (США): c-fos(4) sc-52 в разведении 1:500-для выявления Fos-иммунореактивности, AR(c-19) sc 815 в разведении 1:50 и 1:100 - для выявления иммунореактивности к рецептору андрогенов и GR(M-20) sc 1004 в разведении 1:50 и 1:100 - для выявления иммунореактивности к рецептору глюкокортикоидов.

Адаптация методики иммуногистохимического окрашивания на белок Fos для рецепторной ткани ВНО.

Для адаптации иммуногистохимического окрашивания на белок Fos для рецепторной ткани ВНО мы экспонировали самцов домовый мыши к подстилке рецептивной самки в течение временных промежутков разной длительности, а именно: 45, 60, 70, 90 и 110 минут. По окончании воздействия животных перфузировали физиологическим раствором и раствором формалина через сердце, перфузия осуществлялась под нембуталовым наркозом (40мг/кг). ВНО извлекали вместе с хрящевой капсулой, и после дополнительной фиксации в 4% растворе формалина и криопротекции изготавливали на криостате серийные срезы ткани ВНО. Препараты окрашивали по методу описанному выше.

Для подтверждения правомочности использования метода для выявления Fos-иммунореактивности как ответа на предъявление запаха эстральной самки 2-х самцов *Mus musculus domesticus* экспонировали в течение 90 минут к подстилке самки *Mus musculus domesticus*, а еще 2-х – к подстилке самки *Mus spicilegus*. Затем

следовала уже описанная процедура перфузии и изготовления препаратов ткани ВНО.

Оценка влияния стресса на восприятие хемосигналов рецептивной самки на уровне реализации поведенческих эффектов осуществлялась при помощи стандартного теста, основанного на предпочтении сексуально опытными самцами запаха самки своего вида, находящейся на стадии эструса, запаху самки в стадии диэструса. Так известно, что при предъявлении самцам грызунов двух вышеупомянутых образцов запаха, сексуально опытные самцы затрачивают большее количество времени на исследование образца запаха рецептивной самки по сравнению с образцом, полученным от самки, находящейся на стадии диэструса (Hayashi, Kimura, 1974). Единственным параметром, регистрируемым в данном тесте, является время, затрачиваемое на принюхивание к определенному образцу. В качестве образцов запаха использовали мочу самок домашней мыши, находящихся на стадии эструса и диэструса, нанесенную на фильтровальную бумагу. Тестирование длилось 10 минут.

Исследование влияния стрессорных факторов на рецепцию хемосигналов рецептивной самки самцами домашней мыши на уровне выстилки ВНО.

После холодового воздействия (4°C, 2ч) или эмоционального стресса (10 дней в присутствии запаха домашней кошки) самцов домашней мыши в течение 90 минут экспонировали к подстилке рецептивной самки, затем изготавливали препараты по вышеописанной методике. Активность клеток рецепторной выстилки ВНО оценивали при помощи иммуногистохимического окрашивания срезов ВНО с применением антител против белка Fos. Количественную оценку результатов осуществляли при помощи программы Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>).

Изучение иммунореактивности к рецептору андрогенов (AR) и глюкокортикоидов (GR) в рецепторной ткани ВНО самцов домашней мыши.

Для выявления AR- и GR- иммунореактивности на срезах ВНО была использован метод иммуногистохимического окрашивания с использованием соответствующих антител (см. выше). Как в случае GR-иммунореактивности, так и в случае AR-иммунореактивности, оценку проводили в двух независимых сериях экспериментов. На контрольные образцы вместо раствора первичных антител наносили буфер или раствор нормальной сыворотки. В качестве положительного контроля в обоих случаях использовали ткань ООЛ.

Определение содержания гормонов в плазме крови методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

Измерение уровня тестостерона и кортикостерона в образцах плазмы осуществляли с использованием готовых наборов для ИФА производства DRG EIA-1559 и EIA-

4164, соответственно, и планшетного спектрофотометра SpectraMax 340PC 384. Анализ результатов измерения проводили в программе SpectraMax Software (<http://www.moleculardevices.com/pages/software/softmax.html>).

Статистическая обработка данных

При обработке результатов были использованы стандартные методы статистического анализа. Вычислялись средние, стандартные отклонения и стандартные ошибки среднего массива данных. При сравнении характеристик массивов данных были использованы непараметрические критерии (Вилкоксона-Манна-Уитни, критерий Вилкоксона для связанных выборок). Анализ производился при помощи пакета статистических программ STATISTIKA 7.0 .

Результаты и обсуждение

Адаптация методики иммуногистохимического окрашивания на белок Fos для рецепторной ткани вомероназального органа.

На момент начала экспериментальной работы нам не удалось обнаружить публикаций, в которых для визуализации активности нервных клеток ВНО использовалась бы методика окрашивания на белок Fos. В большинстве исследований, выполненных на ткани обонятельных луковиц, необходимым и достаточным для обнаружения активированных клеток при помощи упомянутого метода предполагается интервал времени в 45-60 минут от начала стимуляции. Активация транскрипции *c-fos* происходит в течение первых 5 минут, а максимальное количество мРНК накапливается в клетке через 30-45 минут от начала действия стимула. Время полужизни белка Fos составляет около двух часов, а предполагаемое время достижения пиковой концентрации в клетке 60 минут после начала экспрессии (Morgan, Curran, 1991; Muller et al., 1984). Однако кинетика накопления белка в различных типах клеток может быть различной и зависит от целого ряда параметров (Hargrove, Schmidt, 1989). В предварительных опытах при экспонировании самцов домового мыши к моче эстральной самки нам не удалось выявить Fos-иммунореактивность в рецепторной ткани ВНО при длительности экспозиции, используемой для оценки активности клеток ООЛ. Мы предположили, что отсутствие окрашивания в рецепторной ткани ВНО было связано с недостаточным количеством белка Fos. Учитывая вышесказанное, продолжительность стимуляции была увеличена. Выраженная Fos-иммунореактивность на срезах рецепторной ткани ВНО самцов домового мыши, была выявлена лишь после 90-минутной экспозиции с подстилкой, содержащей мочу рецептивной самки. В опытах с продолжительностью стимуляции 70 и 110 минут Fos-иммунореактивность была крайне слабо выражена или же вообще отсутствовала. По всей видимости, в клетках ВНО накапливается относительно

небольшое количество белка Fos, и ранее чем через 90 минут он не может быть обнаружен методами иммуногистохимии при помощи использованных нами антител. Это предположение дополнительно подтверждает тот факт, что концентрацию первичных антител также пришлось увеличить (по сравнению с используемой нами для иммуногистохимии на срезах обонятельной луковицы).

Правомочность использования методики иммуногистохимического окрашивания на белок Fos для оценки активации нейронов рецепторной выстилки ВНО была подтверждена в опытах на дикоживущих видах мышей: *Mus spicilegus* и *Mus musculus domesticus*. Поскольку представители упомянутых видов не скрещиваются между собой, было бы логично предположить, что ответ рецепторных клеток ВНО в случае экспозиции к запаху чужого вида будет слабым. После экспозиции подстилки самки *Mus musculus domesticus* в эструсе самцу своего вида нами была выявлена выраженная Fos-иммунореактивность в рецепторной ткани ВНО. В случае же экспозиции подстилки самки *Mus spicilegus* в эструсе самцу *Mus musculus domesticus* иммунореактивность к белку Fos была значительно более слабо выражена и локализовалась преимущественно в апикальной части эпителия ВНО, предположительно участвующей в рецепции летучих соединений. Такие результаты дополнительно подтверждают корректность использования метода окрашивания на Fos для изучения восприятия химических сигналов рецептивной самки самцами домашней мыши на уровне рецепторного эпителия ВНО.

Исследование влияния стрессующих факторов на рецепцию химических сигналов рецептивной самки самцами домашней мыши на уровне выстилки вомероназального органа

Самцов домашней мыши экспонировали к подстилке, содержащей химические сигналы самки, в течение 90 минут. Очевидно, что моча и другие выделения эстральной самки, которые может содержать подстилка, имеют сложный химический состав и содержат как летучие соединения, так вещества с высокой молекулярной массой. В настоящее время показано, что рецепторами нейронов базальной части ВНО воспринимаются соединения белково-пептидной природы, а рецепторы, экспрессирующиеся в апикальной части ВНО, ближе к просвету органа, способны связывать как летучие соединения, так и вещества с относительно высокой молекулярной массой (нелетучие) (Kimoto et al., 2005; Leinders-Zufall et al., 2004). После экспонирования самцов домашней мыши к подстилке, содержащей химические сигналы эстральной самки, Fos-иммунореактивность была обнаружена, как в базальной, так и в апикальной (расположенной ближе к просвету), зонах рецепторного эпителия ВНО, что соответствует многокомпонентности сигнала

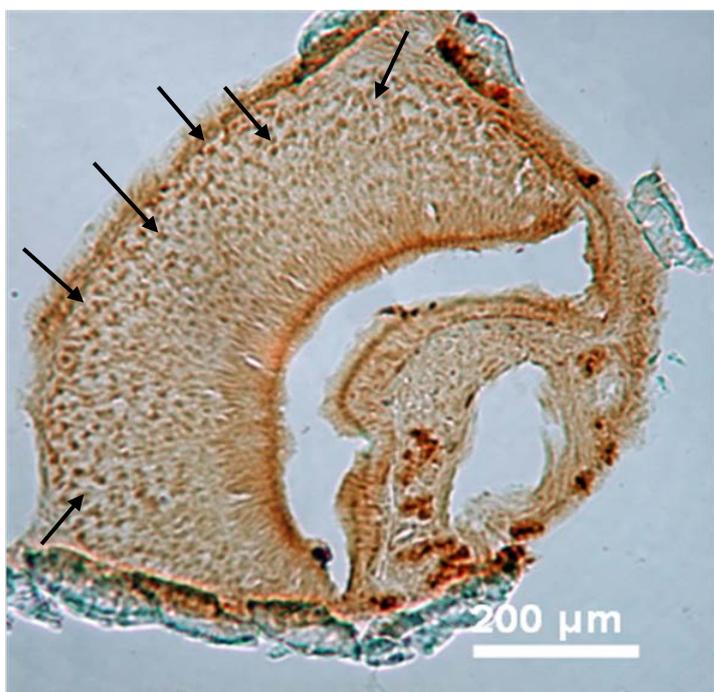


Рис.1 Fos-иммунореактивность в рецепторной ткани ВНО самца домового мыши после экспозиции к запаху эстральной самки, n=20.

клетки отсутствовали.

Полученные результаты согласуются с данными исследований, проводившихся на уровне ДОЛ самцов крыс (Portillo et al., 2006) и мышей (Dudley, Moss, 1999; Matsuoka et al., 1999) Так Матсуока с соавторами показали, что экспозиция самцов линии ICR к подстилке рецептивной самки вызывает значительное развитие Fos-иммунореактивности в ростральной части ДОЛ. При этом экспозиция к чистой подстилке приводила к появлению лишь незначительного количества окрашенных ядер на срезах ДОЛ (Matsuoka et al., 1999).

Для изучения влияния стрессирующих факторов на рецепцию химических сигналов рецептивной самки самцами домового мыши нами был выбран холодовой стресс, как вид внешнего воздействия, с которым животные часто сталкиваются в естественной среде обитания. В качестве физиологического показателя уровня стрессированности животных при использовании холодового воздействия мы оценивали уровень одного из основных гормонов стресса – кортикостерона. Кортикостерон является основным глюкокортикоидом у грызунов. Повышение уровня глюкокортикоидов происходит в первые минуты после начала воздействия и согласно классической концепции Ганса Селье является одним из основных компонентов адаптационного ответа на стресс (Selye, 1936; Selye, 1950). Содержание самцов домового мыши при 4°C в течение двух часов перед началом эксперимента привело достоверному (n= 13 (7 и 6 в каждой группе)p=0,042)

(рис.1). Основная часть Fos-положительных клеток была локализована в ростральной части ВНО. В ВНО самцов домового мыши, экспонированных к подстилке, взятой от самки, находившейся на стадии диэструса, Fos-иммунореактивность была выражена крайне слабо: в рецепторном эпителии присутствовали лишь отдельные окрашенные клетки. На срезах рецепторной ткани ВНО контрольных животных, экспонированных к чистой подстилке, Fos-положительные

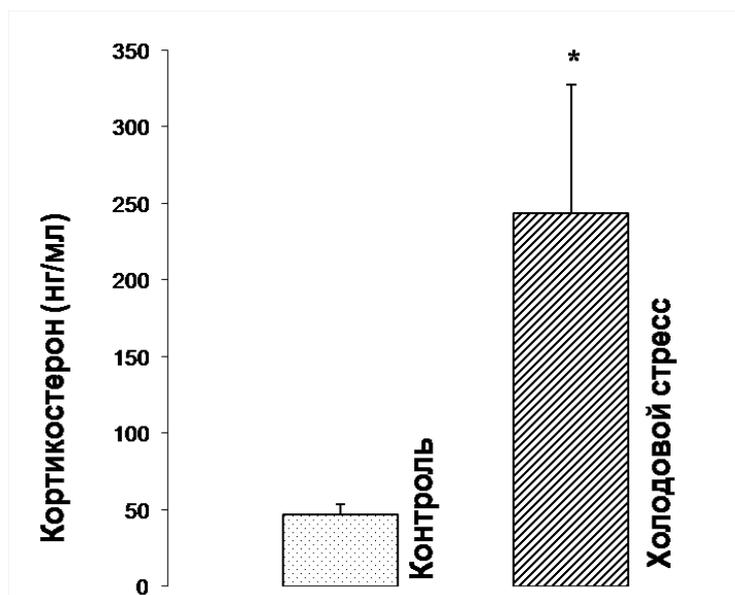


Рис.2 Влияние холодового стресса на уровень кортикостерона в плазме крови самцов домово́й мыши, $*-p \leq 0.05$ по критерию Вилкоксона–Манна–Уитни, \top - стандартная ошибка среднего, $n=6$ и $n=7$ в контрольной и опытной группах соответственно.

повышению уровня кортикостерона в плазме крови (рис.2). Поскольку содержание в условиях низких температур относится к метаболическому типу стресса (Pacak, Palkovits, 2001), то в качестве альтернативного вида воздействия мы использовали хорошо разработанную модель эмоционального стресса - содержание животных в постоянном присутствии запаха хищника в течение 10 дней. Эта модель уже более 20 лет применяется в исследованиях по изучению социального поведения грызунов (Blanchard et al., 2003; Blanchard et al., 2001). Содержание самцов домово́й мыши в условиях постоянного присутствия запаха хищника в течение 10 дней привело к достоверному повышению уровня кортикостерона в плазме крови ($n=16$ (по 8 в каждой группе) $p=0,00078$)(рис.3). Основное действие обеспечивают

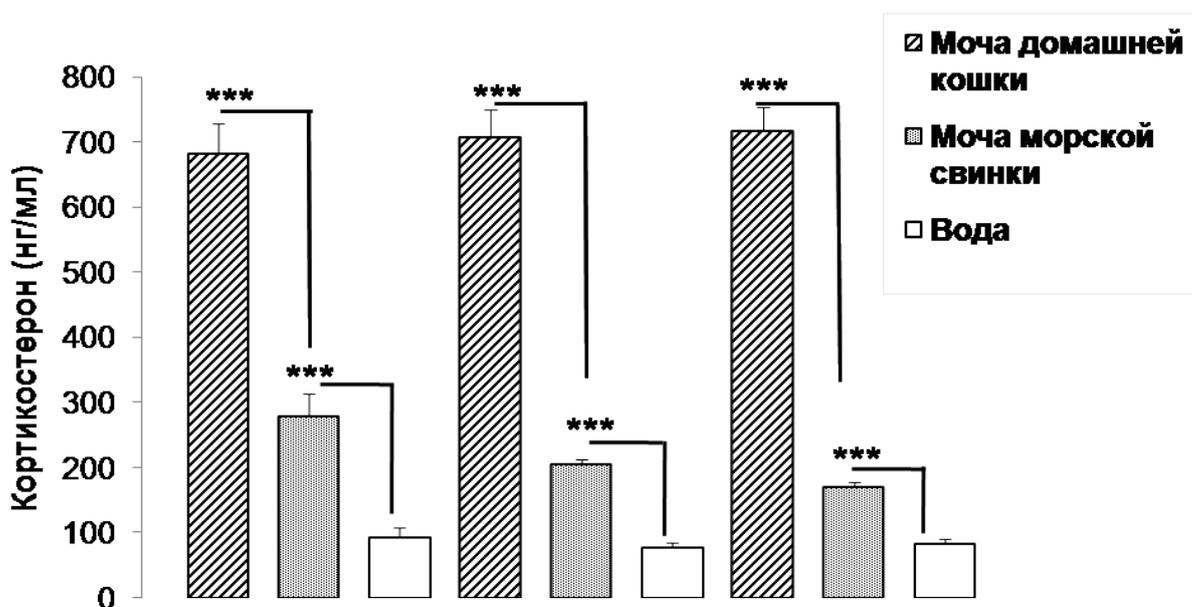


Рис.3 Влияние эмоционального стресса на уровень кортикостерона в плазме крови самцов домово́й мыши. Отображены показатели для 3-го, 7-го и 10-го дня воздействия слева направо, $*-p \leq 0.05$ по критерию Вилкоксона–Манна–Уитни, \top - стандартная ошибка среднего, $n=8$ для каждой группы.

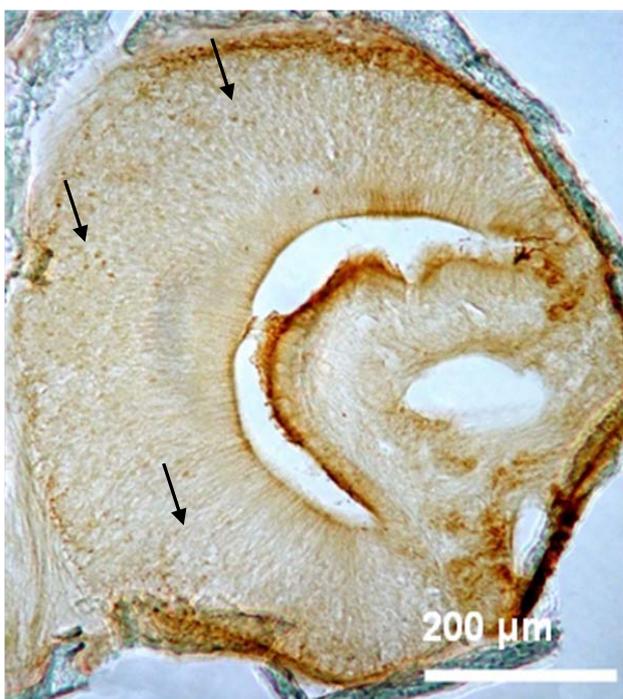


Рис.4 Подавление Fos-иммунореактивности в рецепторной ткани ВНО самца домовой мыши под воздействием холодового стресса, n=10, 6 независимых экспериментов.



Рис.5 Подавление Fos-иммунореактивности в рецепторной ткани ВНО самца домовой мыши после воздействия запахом хищника, n=6, 3 независимых эксперимента.

специфические химические сигналы, содержащиеся в моче кота, а не некие общие компоненты мочи, так как применение мочи морской свинки оказывало значительное более слабый эффект.

Содержание самцов домовой мыши при 4°C в течение двух часов перед началом эксперимента привело к подавлению Fos-иммунореактивности в рецепторной ткани ВНО в ответ на экспозицию к химическим сигналам рецептивной самки (рис.4).

Воздействие запахом хищника в течение 10 дней перед экспозицией к запаху эстральной самки дало сходные результаты на уровне рецепторной выстилки ВНО (рис.5). Подсчет Fos-положительных клеток в рецепторном эпителии ВНО, выявляемых после экспозиции к подстилке рецептивной самки, показал, что у животных, подвергшихся холодовому стрессу, их количество было снижено в 5 раз (рис.6).

Исследование влияния стресса на восприятие сигналов рецептивной самки на уровне поведения.

Для оценки значимости угнетения ответа клеток рецепторного эпителия

ВНО для восприятия химических сигналов рецептивной самки оценивали реакцию самцов домовой мыши на запах самок, находящихся на разных стадиях цикла. С этой целью был

использован уже упоминавшийся ранее (стр.7) стандартный тест, основанный на

предпочтении самцами запаха рецептивной самки по отношению к таковому самки, находящейся на стадии диэструса.

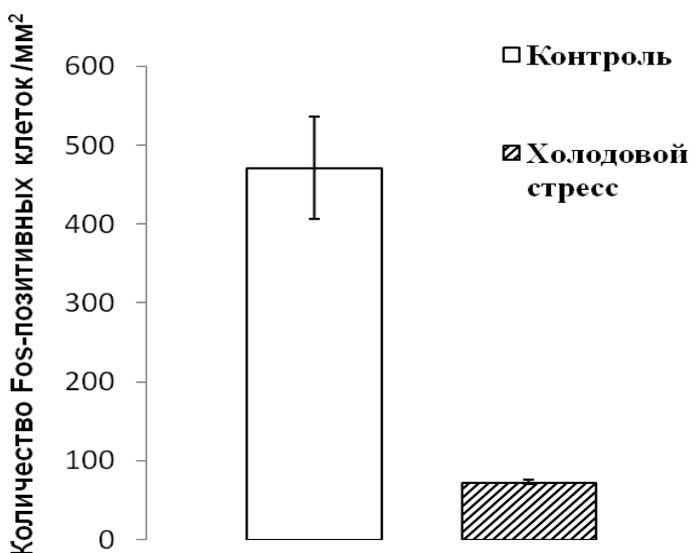


Рис.6 Снижение количества Fos-позитивных клеток в рецепторной ткани ВНО самцов домашней мыши под воздействием холодового стресса

Животные контрольной группы (n=11) затрачивали достоверно больше времени на исследование образца запаха рецептивной самки по сравнению с образцом запаха самки, находившейся в стадии диэструса (по критерию Вилкоксона для связанных выборок $p=0.047$) (рис.7). Самцы, находившиеся перед началом опыта под воздействием низких температур (n=13), не демонстрировали предпочтения по отношению к запаху рецептивной самки ($p=0.099$ по критерию Вилкоксона для связанных выборок) (рис.8).

Воздействие запахом хищника в течение десяти дней оказало сходное влияние: стрессированные животные (n=8), согласно нашим данным, были неспособны отличить запах эстральной самки от запаха самки, находившейся в стадии диэструса ($p=0.575$ по критерию Вилкоксона для связанных выборок) (рис.9).

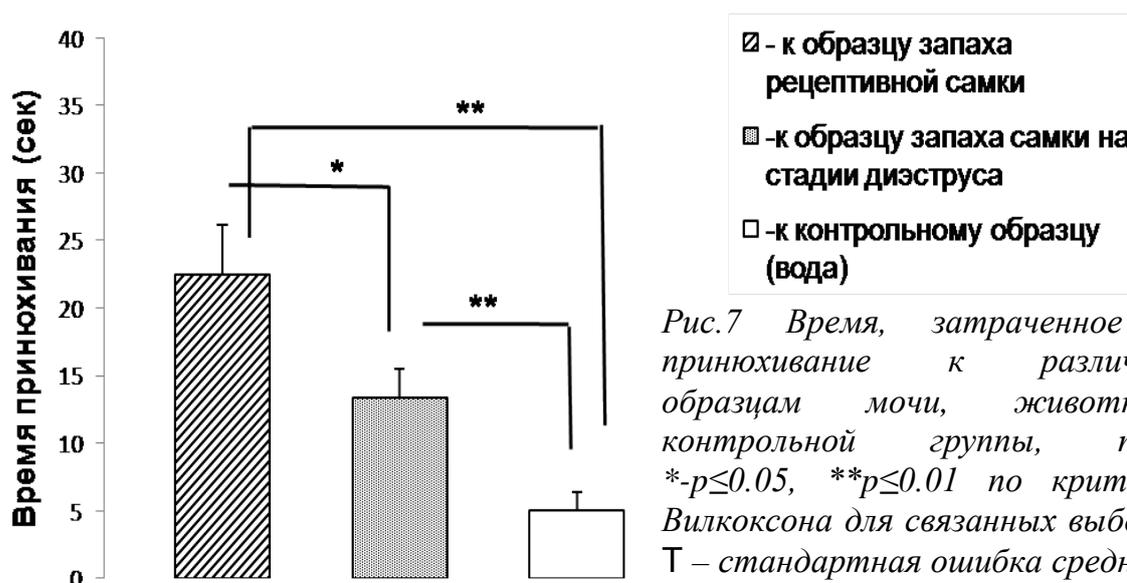
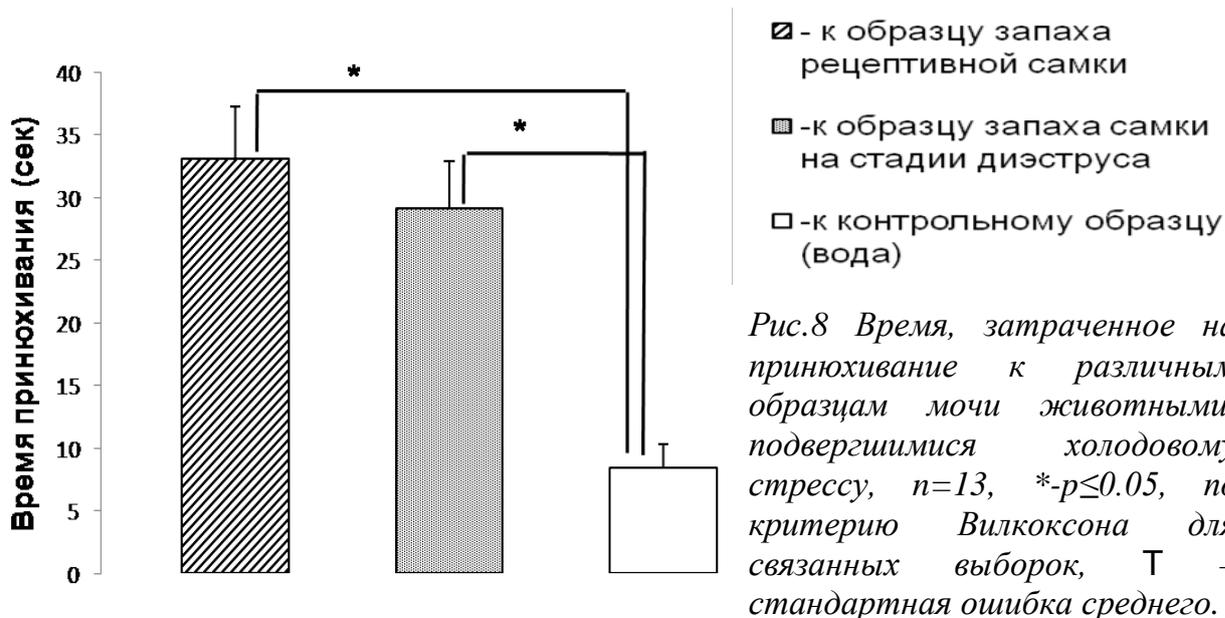


Рис.7 Время, затраченное на принюхивание к различным образцам мочи, животными контрольной группы, n=11, *- $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ по критерию Вилкоксона для связанных выборок, T – стандартная ошибка среднего

Самцы контрольной группы и группы, находившейся под воздействием запаха хищника, отдавали предпочтение образцам мочи по сравнению с водой. Время принюхивания к образцам мочи было достоверно больше как в случае рецептивной



самки ($p=0.003$ для контрольной группы и $p=0.012$ для группы, находившейся под воздействием запаха хищника, по критерию Вилкоксона для связанных выборок), так и при использовании выделений самки в стадии диэструса ($p=0.008$ для контрольной группы и $p=0.012$ для группы, находившейся под воздействием запаха хищника, по критерию Вилкоксона для связанных выборок). Самцы группы, подвергавшейся холодовому воздействию, также затрачивали больше времени на исследование образца запаха рецептивной самки по сравнению с контрольным образцом ($p=0.025$ по критерию Вилкоксона для связанных выборок); при сравнении времени принюхивания к контрольному образцу и образцу запаха нерецептивной самки достоверных различий выявить не удалось ($p=0.247$ по критерию Вилкоксона для связанных выборок).

Снижение времени принюхивания к образцам мочи рецептивных самок не было связано со снижением исследовательской активности под воздействием стресса, на



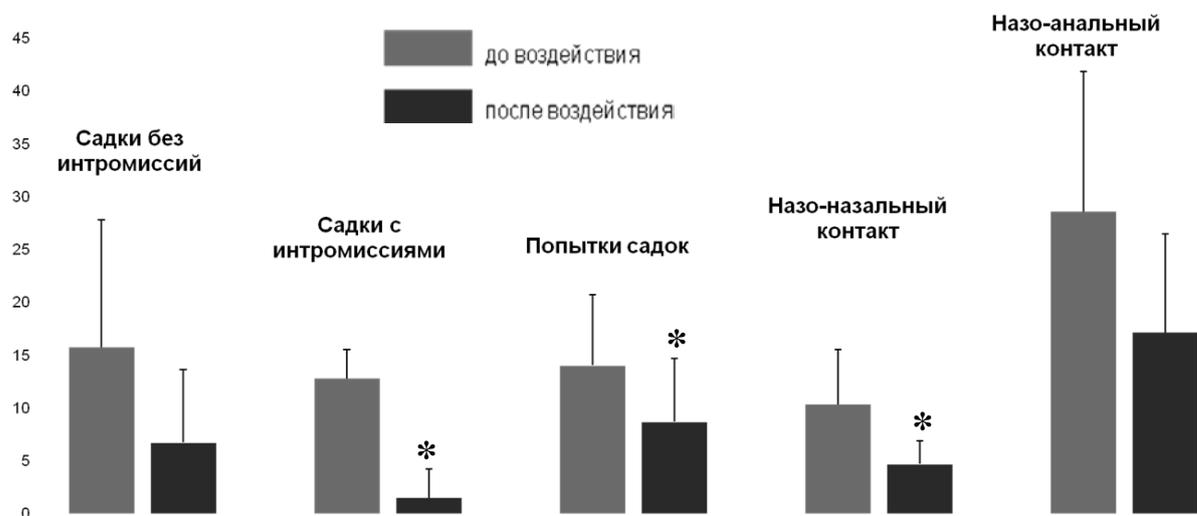


Рис.10 Влияние стресса на некоторые параметры полового поведения, $n=10$, T-стандартное отклонение, $*-p \leq 0.05$, по критерию Вилкоксона для связанных выборок.

что указывает отсутствие различий по суммарному времени принюхивания ко всем образцам между контрольной группой и группой животных, подвергшихся холодovому воздействию; животные же, подвергшиеся эмоциональному стрессу, тратили достоверно больше времени на исследование предложенных образцов по сравнению с животными двух других групп. Следует отметить тот факт, что увеличение времени исследования образцов запаха у эмоционально стрессированных самцов домово́й мыши происходило за счет более длительного принюхивания к образцам мочи (по критерию Вилкоксона-Манна Уитни $p=0.051$ и $p=0.012$ для времени принюхивания к образцу мочи эстральной самки при сравнении с контрольной группой и группой, подвергшейся холодovому стрессу, соответственно; $p=0.005$ для времени принюхивания к образцу мочи самки на стадии диэструса, при сравнении с контрольной группой и $p=0.003$ при сравнении группой животных, подвергшихся холодovому стрессу). При этом межгрупповых различий во времени принюхивания к контрольным образцам выявлено не было. Для подтверждения связи между предпочтением запаха рецептивной самки и реализацией полового поведения мы дополнительно оценивали влияние долговременного воздействия запахом хищника на основные параметры полового поведения самцов домово́й мыши. Самцов домово́й мыши ($n=10$) ссаживали с самкой того же вида, находящейся в стадии эструса, параметры полового поведения регистрировали в течение 60 минут. Опыт проводили до воздействия запахом хищника и после.

Воздействие запахом хищника привело к достоверному снижению таких параметров полового поведения самцов домово́й мыши, как количество садок с

интросмиссиями ($p=0,028$ по критерию Вилкоксона для связанных выборок) и попыток садок ($p=0,017$ по критерию Вилкоксона для связанных выборок). Кроме того, достоверно снизился интерес к рецептивной самке, что отражено достоверным снижением количества назо-назальных контактов ($p= 0,036$ по критерию Вилкоксона для связанных выборок) и тенденцией ($p= 0,067$ по критерию Вилкоксона для связанных выборок) к снижению количества назо-анальных контактов между потенциальными партнерами (рис.10).

Из описанных результатов следует, что оба вида стресса снижают интерес самцов домовый мыши к запаху рецептивной самки. Этот эффект не связан со снижением исследовательской активности, и возможно, вносит вклад в подавление полового поведения. Такое влияние стресса сходно с изменениями в поведении самцов грызунов, наблюдаемыми после удаления ВНО. Более ранними исследованиями показано, что после удаления ВНО самцы грызунов одинаково долго исследуют образцы мочи интактных самцов и рецептивных самок, в то время как ложнооперированные животные демонстрируют выраженное предпочтение запаха рецептивной самки (Beauchamp et al., 1982; Pankevich et al., 2004). Эти эффекты, по всей видимости, связаны не с нарушением способности различить образцы мочи самки и самца, а со снижением мотивации к исследованию образцов, содержащих химические сигналы эстральной самки. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что самцы грызунов после удаления ВНО сохраняют способность различать те же запахи в тесте на привыкание (в этом тесте животным последовательно предлагают несколько раз один и тот же запах, а потом новый.), то есть в случае появления элемента новизны (Pankevich et al., 2004). Очевидно, что распознавание запахов в этом случае обеспечивает ООС.

Таким образом, результаты поведенческих исследований согласуются с нашей гипотезой о возможности подавления ответа рецепторных клеток ВНО самцов домовый мыши на химические сигналы рецептивной самки под воздействием стресса. Подавление ответа рецепторных клеток ВНО свидетельствует о снижении значимости информации, поступающей по этому каналу в условиях стресса. Сопутствующие изменения в половом поведении указывают на то, что модуляция восприятия химических сигналов ДОС под действием стресса может служить одним из физиологических механизмов регуляции численности популяций.

Исследование возможных физиологических механизмов, обеспечивающих модуляцию сигнала на уровне рецепторной ткани вомероназального органа

Большой интерес представляет не только само явление регуляции стрессом ответа рецепторных клеток ВНО, но и механизмы, лежащие в его основе. Одним из наиболее вероятных общих компонентов ответа на оба вида стресса,

использованных в нашей работе, может быть подъем уровня глюкокортикоидов в крови стрессированных животных. Хорошо известно, что непосредственным ответом на стресс является повышение уровня глюкокортикоидов в плазме крови, что, в свою очередь, влечет за собой падение уровня тестостерона. Как уже упоминалось, оба вида стресса, использованных в работе, привели к достоверному повышению уровня кортикостерона. Измерение уровня тестостерона в плазме крови самцов домового мыши, подвергшихся низкотемпературному воздействию, показало более низкий уровень данного гормона по сравнению с контрольной группой животных. Отсутствие статистической достоверности в данном опыте ($p=0,063$ по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни), очевидно, связано с высокой вариабельностью внутри группы, являющейся следствием использования нелинейных животных гетерогенной лабораторной популяции.

Измерение уровня тестостерона в плазме крови мышей, подвергшихся воздействию запаха хищника, не проводилось, поскольку многочисленными исследованиями показано, что хронический стресс, сопровождающийся повышенным уровнем глюкокортикоидов, подавляет синтез тестостерона в клетках Лейдига семенников (Pfaff, 2002; Blanchard et al., 1993).

Уровень упомянутых гормонов потенциально может оказывать непосредственное влияние, как на рецепторные клетки, так и на нейроны центральной нервной системы, участвующие в обработке ольфакторной информации.

Изучение иммунореактивности к рецептору андрогенов (AR) в рецепторной ткани ВНО самцов домового мыши.

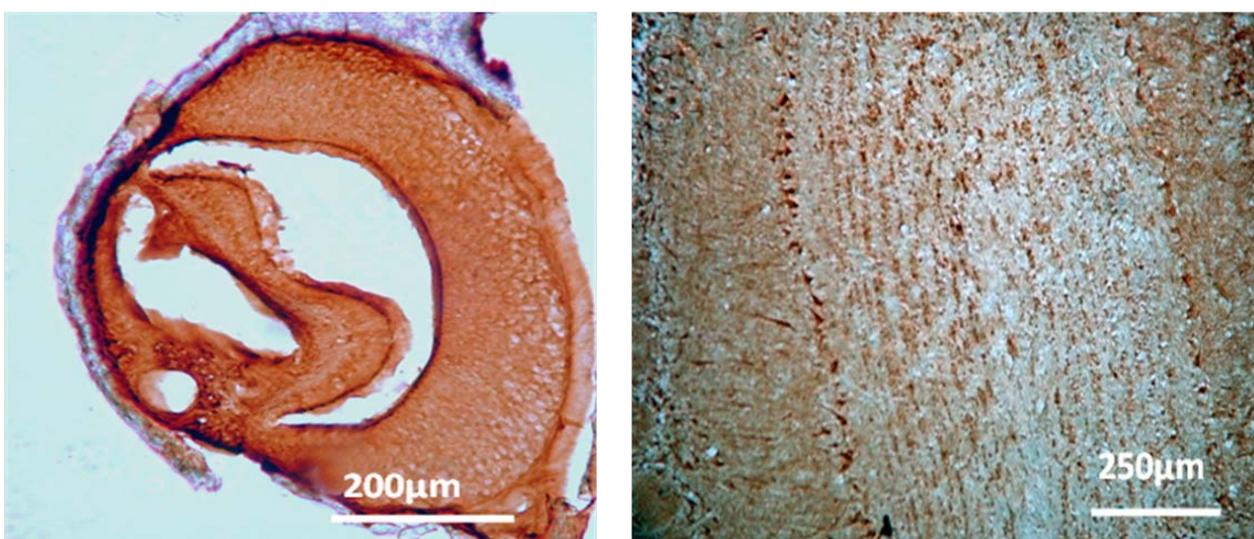


Рис.11 Отсутствие иммунореактивности к рецептору андрогенов в рецепторной ткани ВНО(1), иммунореактивность к рецептору андрогенов в ткани ООЛ(2), $n=4$, 2 независимых эксперимента.

Отсутствие рецептора андрогенов в рецепторной ткани ВНО мыши на сегодняшний день было показано только в одной работе (Alekseyenko et al., 2006), с

целью подтверждения или опровержения этих результатов были проведены дополнительные исследования. Иммуногистохимия на срезах ВНО с применением антител против рецептора андрогенов (Santa Cruz Biotechnology, AR(c-19) sc 815) показала отсутствие AR-иммунореактивности в рецепторной ткани ВНО (рис.11). При этом на срезах ОЛ, служивших положительным контролем, AR-иммунореактивность была хорошо выражена (рис.11).

Таким образом, полученные нами результаты согласуются с литературными данными. Следует отметить, что в рецепторном эпителии крысы иммунореактивность к рецептору андрогенов также не была обнаружена (Nunez Chichet et al., 2007). Поскольку нами и авторами упомянутых работ были использованы антитела, специфически связывающиеся с различными эпитопами AR, то можно говорить об отсутствии значимых количеств данного белка в рецепторной ткани ВНО.

Отсутствие рецептора андрогенов в рецепторной ткани ВНО не исключает возможность прямого действия тестостерона на рецепторные нейроны ВНО, поскольку этот гормон, может путем ароматизации превращаться в эстрогены и действовать через соответствующий рецептор (ER) (Brown R.E., 1994). Данные об экспрессии и активности ароматазы (CYP19A1) в рецепторной ткани ВНО на сегодняшний день отсутствуют. Касательно экспрессии рецептора эстрогенов в рецепторной ткани ВНО литературные данные противоречивы. Алексеенко с соавторами (Alekseyenko et al., 2006), методами иммуногистохимии показали отсутствие как ER- α , так и ER- β , в рецепторном эпителии ВНО самцов мышей линии Свисс-Вебстер. В то же время Таками и др. (Takami et al., 2008) сообщают, что им удалось выявить ER- α – иммунореактивность, локализирующуюся в апикальных дендритах рецепторных клеток ВНО крыс линии Спраг-Доули обоих полов.

Изучение иммунореактивности к рецептору глюкокортикоидов (GR) в рецепторной ткани ВНО самцов домово́й мыши.

Данные об экспрессии рецептора глюкокортикоидов в рецепторном эпителии ВНО в современной литературе отсутствуют. Для выявления наличия или отсутствия рецептора глюкокортикоидов в рецепторном эпителии ВНО домово́й мыши был использован метод иммуногистохимического окрашивания срезов ВНО с использованием антител против рецептора глюкокортикоидов (Santa Cruz Biotechnology, GR(M-20) sc 1004). В качестве положительного контроля была использована ткань основной обонятельной луковицы, для которой показана экспрессия данного белка (Sousa et al., 1989).

Из рис.12 видно, что в рецепторной ткани ВНО хорошо выражена иммунореактивность к рецептору глюкокортикоидов. На контрольных срезах (без использования первичных антител, а также с применением нормальной сыворотки вместо первичных антител) окрашивание в рецепторной зоне отсутствовало. Результаты были идентичны в двух независимых экспериментах.

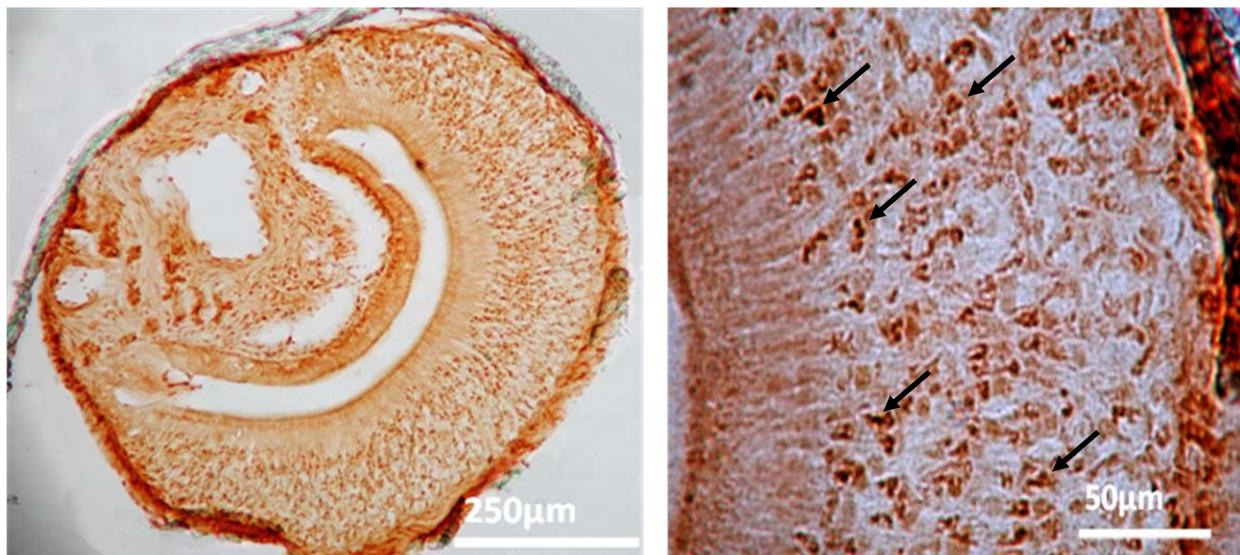


Рис.12 Иммунореактивность к рецептору глюкокортикоидов в рецепторной ткани ВНО, n=5, 2 независимых эксперимента.

Присутствие иммунореактивности к рецептору глюкокортикоидов в эпителии ВНО указывает на чувствительность этой ткани к уровню глюкокортикоидов, а также подтверждает возможность прямого действия кортикостерона на рецепторные клетки.

Рецептор глюкокортикоидов, как и рецептор андрогенов, принадлежит к семейству ядерных рецепторов и в отсутствии лиганда локализуется в цитоплазме. После связывания с лигандом рецептор глюкокортикоидов перемещается в ядро, где он сам выступает в роли транскрипционного фактора, а также может регулировать активность других транскрипционных факторов, таких как AP-1, NF- κ B и CREB (Adcock, Ito, 2000). Рецептор глюкокортикоидов регулирует экспрессию целого ряда генов-мишеней, в том числе ионных транспортеров и рецепторов нейромедиаторов (So et al., 2007; Arenas et al., 2008). Активация рецептора глюкокортикоидов может оказывать влияние на возбудимость нейронов ЦНС. Такого рода эффекты описаны для нейронов С1 гиппокампа, нейронов ядер шва и паравентрикулярного ядра (Laaris et al., 1995; Verkuyl et al., 2005; Joels, 2006).

Механизм реализации эффектов глюкокортикоидов в рецепторных нейронах ВНО, безусловно, является предметом отдельного исследования. Однако, можно предположить, что подавление ответа в случае короткого стрессового воздействия, скорее связано с негеномными эффектами активации рецептора глюкокортикоидов,

так как геномные эффекты, реализующиеся через рецептор глюкокортикоидов и требующие синтеза белков *de novo*, несколько отставлены во времени. В случае же хронического стресса представляется вероятным влияние активации рецептора глюкокортикоидов на экспрессию вомероназальных рецепторов в нейронах ВНО. Предлагаемый нами механизм угнетения ответа рецепторных клеток ВНО через прямое действие кортикостерона, безусловно, не является единственно возможным. И рассматривается нами исключительно как часть многокомпонентного воздействия. В частности, представляется интересным исследование влияния катехоламинов на рецепцию химических сигналов ДОЛ млекопитающих. Для подтверждения рассмотренного в нашей работе механизма мы предполагаем провести ряд фармакологических исследований.

ВЫВОДЫ

1. Модуляция восприятия химических сигналов на уровне периферического звена ДОС под действием стресса снижает уровень информационной значимости обонятельных сигналов для организации репродуктивного поведения и может служить одним из механизмов регуляции численности популяций грызунов.
2. Полученные результаты указывают на вовлечение глюкокортикоидов в механизмы регуляции восприятия химических сигналов на рецепторном уровне дополнительной обонятельной системы.
3. Методами иммуногистохимии показана иммунореактивность к рецептору глюкокортикоидов в рецепторной ткани вомероназального органа доменной мыши.
4. В рецепторном эпителии вомероназального органа доменной мыши методами иммуногистохимии не обнаружена иммунореактивность к рецептору андрогенов.
5. Холодовой стресс вызывает 5-ти кратное снижение количества Fos-позитивных клеток в рецепторной ткани вомероназального органа самцов мышей после экспозиции к химическим сигналам рецептивной самки. Долговременный эмоциональный стресс подавляет Fos-иммунореактивность, вызванную экспозицией к запаху рецептивной самки, в рецепторной ткани ВНО самцов доменной мыши.
6. Согласно нашим данным, самцы доменной мыши, подвергшиеся холодovому и продолжительному эмоциональному стрессу, в стандартном тесте на принюхивание не демонстрируют предпочтения химических сигналов рецептивной самки по сравнению с таковыми нерепцептивной самки.

Список работ опубликованных по теме диссертации

1. **Вознесенская А.Е.** Роль эмоционального стресса в рецепции половых феромонов у домашней мыши // Сенсорные системы. 2009. Т. 23. № 1. С. 66-71.
2. Feoktistova N.Yu, Naidenko Sv.V., **Voznesenskaia A.E.**, Krivomazov G.D., Clark L., Voznessenskaya V.V. The Influence of Predator Odours and Overcrowded Mice Odours on Regulation of Oestrous Cycles in House Mice (*Mus Musculus*) // *Rats, Mice and People: Rodent Biology and Management* / Editors: G.R.Singleton, L.A.Hinds, C.J.Krebs ACIAR Monograph, 2003. pp.173-175.
3. **Вознесенская А.Е.** Роль стресса в восприятии половых феромонов у домашней мыши // Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых. Материалы Конференции молодых сотрудников и аспирантов Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова. Москва: Товарищество научных издательств КМК, 2008. С. 82-91.
4. **Вознесенская А.Е.** Роль гормонального статуса реципиента сигнала в восприятии феромонов у домашней мыши // Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых. Материалы конференции молодых сотрудников и аспирантов ИПЭЭ РАН. Москва: Товарищество научных издательств КМК, 2006. С. 87-91.
5. **Вознесенская А.Е.**, Ключникова М.А., Вознесенская В.В. Влияние запаха хищника на материнское поведение у грызунов // Научные труды МПГУ. Москва: Прометей, 2006. С. 374-377.
6. Амбарян А.В., **Вознесенская А.Е.** Механизмы прекопуляционной репродуктивной изоляции у домашних мышей надвидового комплекса *Mus musculus s.lato* // Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых. Материалы конференции молодых сотрудников и аспирантов ИПЭЭ РАН. Москва: КМК, 2006.С. 4-10.
7. Амбарян А.В., **Вознесенская А.Е.** Этологические и физиологические механизмы прекопуляционной изоляции у домашних мышей надвидового комплекса *Mus musculus s.l.* // Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых. Материалы конференции молодых сотрудников и аспирантов ИПЭЭ РАН. Москва: КМК, 2004. С. 4-8.
8. **Voznesenskaia A.E.** The role of Hormonal Status of Signal Recipient in Pheromone Reception in House Mouse // *Chemical Senses*, 2006, 31(8). E24-25
9. **Voznesenskaia A.E.** Exposure to Stress Affects Reception of Sex Pheromones in House Mouse. // *Chemical Senses*. 2008. 33(8). S.48.
10. **Voznesenskaia A.E.**, Minor A.V. Reception of Sex Pheromones in House Mouse is Affected by Exposure to Stress // *Chemical Senses*. 2009. 34(3). E33.
11. Ambaryan A.V., **Voznesenskaia A.E.**, Kotenkova E.V., Voznessenskaya V.V. Chemical Signals may play a critical Role in reproductive isolation of Closely Related *Mus* Species // *Chemical Senses*. 2009. V.34(3). E.65.
12. Voznessenskaya V.V., Klyuchnikova M.A., **Voznesenskaia A.E.** The Role of Vomeronasal Organ in Mediating Responses to Predator Odor // *Chemical Senses*. 2007. 32(6). A.33-34.

- 13. Вознесенская А.Е.** Роль гормонального статуса реципиента сигнала в рецепции феромонов у домового мыш (Mus musculus) // «Биология - наука XXI века» 10-я Пущинская школа-конференция молодых ученых, посвященная 50-летию Пущинского научного центра РАН. 17-21 апреля 2006 г. Сборник тезисов. Пущино. 2006. С.131.
- 14. Вознесенская А.Е.** Влияние стресса на восприятие феромонов у домового мыш. Материалы 11-й международной школы-конференции молодых ученых «Биология – наука 21 века». Пущино. 2007. С.236.
- 15. Вознесенская А.Е.** Восприятие феромонов у домового мыш: роль гормонального статуса реципиента сигнала // IV Всероссийская конференция по поведению животных. Сборник тезисов. Москва: КМК, 2007. С.46.
- 16. Вознесенская А.Е.** Роль гормонального статуса реципиента сигнала в восприятии феромонов у домового мыш // VIII Съезд Териологического общества. Материалы международного совещания. Москва: КМК, 2007. С.84.

Вознесенская Анна Евгеньевна

**РОЛЬ СТРЕССА В РЕГУЛЯЦИИ ВОСПРИЯТИЯ ХИМИЧЕСКИХ СИГНАЛОВ
РЕЦЕПТИВНОЙ САМКИ У ДОМОВОЙ МЫШИ.**

Работа посвящена изучению влияния стресса на рецепцию и анализ химических сигналов в обонятельной системе млекопитающих. Произведена оценка влияния температурного и эмоционального стресса на восприятие химических сигналов эстральной самки самцами домашней мыши на уровне периферического звена дополнительной обонятельной системы (ДОС) и на уровне поведения. Исследована иммунореактивность к рецептору андрогенов и рецептору глюкокортикоидов в рецепторной ткани ВНО домашней мыши.

Полученные результаты указывают на вовлечение глюкокортикоидов в механизмы регуляции восприятия химических сигналов на рецепторном уровне ДОС.

Voznesenskaia Anna Eugenievna

**THE ROLE OF STRESS IN REGULATION OF RECEPTIVE FEMALE
CHEMOSENSORY CUES PERCEPTION IN HOUSE MOUSE.**

The work is dedicated to the study of stress influence on perception of chemosensory cues in the olfactory system of mammals. The influence of low temperature and emotional stress on perception of chemosensory cues of receptive female by male mice at the receptor level of the accessory olfactory system (AOS) and at the behavioral level was evaluated. The androgen receptor- and glucocorticoid receptor-immunoreactivity in the receptor tissue of the vomeronasal organ have been elucidated.

The data obtained indicate the involvement of glucocorticoids in regulation of chemosensory cues perception regulation at the AOS receptor level.