

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ  
Институт систематики и экологии животных**

УДК 591.5:599.363  
На правах рукописи

Кондратюк Екатерина Юрьевна

**ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЭНДОТОКСИНА НА СОЦИАЛЬНОЕ  
ПОВЕДЕНИЕ И ЭНДОКРИННЫЙ СТАТУС МЫШЕЙ (*MUS MUSCULUS*)  
И ДЖУНГАРСКИХ ХОМЯЧКОВ (*PHODOPUS SUNGORUS*)**

Специальность 03.00.08 - зоология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук



НОВОСИБИРСК – 2005

Работа выполнена в лаборатории физиологических адаптаций позвоночных животных Института систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской Академии Наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук,  
профессор

М. П. Мошкин

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Б.П. Суринов

кандидат биологических наук

М.А. Потапов

Ведущее учреждение:

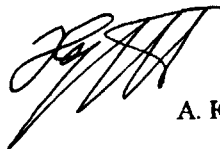
Институт проблем экологии  
и эволюции им. А.Н.Северцова РАН

Защита диссертации состоится 15 ноября 2005 года в 10 часов на заседании диссертационного совета К 003.14.01 в Институте систематики и экологии животных СО РАН по адресу: Новосибирск, 630091, ул. Фрунзе, 11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института систематики и экологии животных СО РАН

Автореферат разослан 12 октября 2005 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук



А. Ю Харитонов

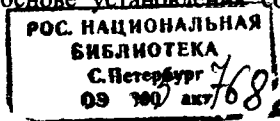
2006-4  
17164

2186902

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы: Распознавание паразитарных антигенов организмом хозяина запускает каскад иммунных процессов со своими “прямыми обязанностями” уничтожить паразитов, а также целый комплекс нейро-эндокринных процессов, влияющих на физиологические функции, поведение животного, в том числе и на механизмы внутривидовой коммуникации.

Поскольку агрессивное поведение, иерархический статус и хемосигналы зависят от функционального состояния систем нейроэндокринной регуляции (Симонов, 1981; Науменко и др., 1983; Gerlinskaya et al., 1993), социальное поведение и запаховая привлекательность инфицированного животного могут изменяться как в результате включения метаболитов паразита в состав летучих компонентов выделений хозяина, так и под влиянием собственных иммуно-нейроэндокринных процессов, развивающихся в организме хозяина в ответ на заражение (Moshkin et al., 2000, Шарецкий и др., 2004). Особую роль в этих процессах играют гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая (ГГНС) и гипоталамо-гипофизарно-гонадная (ГГГС) системы. Изменения в функциональном состоянии этих систем отмечены в результате возникновения иммунной реакции на различные возбудители болезни (Dunlap, Schall, 1995; Willis, Poulin, 2000). В процессе развития иммунного ответа на чужеродные антигены лимфоидными клетками вырабатываются цитокины, которые, являясь медиаторами иммунной и нейроэндокринной систем, модулируют секрецию гормонов ГГНС и ГГГС (Petrovsky, 2001). Эндокринный статус, в свою очередь, оказывает влияние на поведение и хемосигналы зараженных особей. Поэтому инфекционные болезни вносят вклад в формирование визуальных, акустических и ольфакторных сигналов хозяина (Zuk et al., 1990; Clayton, 1991; Moller, 1991; Buchanan et al., 1999). Данные сигналы используются в качестве факторов, контролирующих контакты здоровых животных с инфицированными. К тому же, внутривидовая коммуникация лежит в основе установления социально-



иерархического статуса, проявления агрессивного поведения и выбора полового партнера. Таким образом, иммунную систему можно рассматривать в качестве “шестого органа чувств” (Blalock, 1994), который распознает внедряющихся паразитов и участвует в регуляции поведения хозяина.

Предыдущие исследования нашей лаборатории показали, что активация тимус-зависимыми антигенами специфической линии иммунной защиты приводит к снижению запаховой привлекательности антигенстимулированных самцов (Moshkin et al., 2001; 2002). Вместе с тем, любой паразит несет не только специфические антигены, но и филогенетически древние патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (ПАМП), распознавание которых не требует вовлечения механизмов адаптивного иммунитета. В этой связи возникает вопрос о том, какой вклад в изменение социального поведения и хемокоммуникации вносят ПАМП и, в частности, бактериальный эндотоксин.

Эндотоксины представлены липополисахаридами (ЛПС) и являются компонентами внешней мембраны грамотрицательных бактерий (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*). Их основные представители могут вызывать дизентерию (*Shigella dysenteriae*), гастроэнтерит и брюшной тиф (*Salmonella typhimurium*; *S. paratyphi*), пневмонию (*Klebsiella pneumoniae*), диарею и сепсис (*Escherichia coli*). Эндотоксины присутствуют как во внутренней, так и во внешней среде, обеспечивая, таким образом, видоспецифичную составляющую органической пыли (Roy et al., 2003; Michel, 2003). Являясь филогенетически древним антигеном, ЛПС вызывает активацию неспецифической или врожденной линии иммунной защиты.

До настоящего времени поведенческие эффекты ЛПС были исследованы лишь при моделировании синдрома болезненного поведения, который объединяет такие феномены, как уменьшение двигательной активности, снижение аппетита, подавление исследовательской реакции на ювенильного интродера (Kent et al., 1992; Fishkin et al., 1997; Bilbo et al., 1999; Dantzer, 2001).

Влияние же ЛПС на хемосигналы и коммуникативное поведение остается практически неизученным.

**Цель работы:** Изучение эндокринных, поведенческих и хемокоммуникационных эффектов бактериального эндотоксина у грызунов с разной социальной организацией.

Для достижения поставленной цели исследования проводили на двух видах грызунов (лабораторные мыши, *Mus musculus* и джунгарские хомячки, *Phodopus sungorus*), которые характеризуются различными типами пространственной организации внутривидовых группировок и гормональной регуляции иммунитета.

**Задачи исследования:**

1. Изучить влияние однократного введения разных доз бактериального эндотоксина на эндокринный статус самцов лабораторных мышей;
2. Исследовать хемосигналы и коммуникативное поведение мышей при однократном введении разных доз антигена;
3. Оценить изменения эндокринного статуса и поведения самцов мышей при длительном введении эндотоксина;
4. Изучить действие бактериального эндотоксина на эндокринный статус, хемосигналы и социальное поведение самцов джунгарских хомячков;

**Научная новизна:** В работе впервые получены данные о повышении энергетической стоимости двигательной активности животного при активации неспецифического звена иммунной системы. Несмотря на стрессорный эффект антигенной стимуляции, зарегистрированный по наличию дозозависимого повышения уровня гормонов коры надпочечников, подавления эндокринной функции гонад не зафиксировано. В некоторых случаях наблюдали даже увеличение концентрации половых гормонов. В ходе экспериментов впервые установлено достоверное повышение ольфакторной привлекательности для самок подстилки ЛПС-стимулированных самцов обоих видов.

Впервые показано, что, несмотря на возвращение к исходному уровню через 5 дней после введения ЛПС эндокринных и поведенческих характеристик самцов, у покрытых ими интактных самок отмечена меньшая масса эмбрионов, что можно объяснить уменьшением темпов эмбрионального развития. В наших исследованиях впервые установлено, что толерантность к длительному введению эндотоксина затрагивает не только иммунные и эндокринные реакции, но и агрессивное, и половое поведение самцов мышей.

**Практическая значимость:** Изменение хемосигналов при активации неспецифической иммунной защиты может быть использовано при разработке новых подходов к неинвазивной диагностике инфекционного статуса организмов. Данные о влиянии инфекционных агентов на репродуктивный успех даже на фоне восстановления поведенческих и физиологических параметров полезны для оптимизации проведения профилактических прививок сельскохозяйственных животных.

Материалы диссертации используются при чтении лекций курса популяционной физиологии в Новосибирском и Томском государственных университетах.

**Апробация работы:** Результаты работы были представлены на российских и зарубежных конференциях: «IV Съезд физиологов Сибири» (Новосибирск, 2002), «4<sup>th</sup> International symposium on Physiology and Behaviour of Wild and Zoo Animals» (Berlin, Germany, 2002), «5<sup>th</sup> International symposium on Physiology and Behaviour of Wild and Zoo Animals» (Berlin, Germany, 2004), «XXIX International ethological conference» (Budapest, Hungary, 2005)

**Публикации:** По материалам исследований опубликовано 6 печатных работ, в том числе, 2 в рецензируемых изданиях.

**Структура работы:** Диссертационная работа изложена на 164 страницах и состоит из введения, шести глав текста, выводов, списка использованной литературы (278 наименований, в том числе 211 на иностранных языках) и приложения (6 таблиц). Текст иллюстрирован 25 таблицами и 33 рисунками.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в 2001-2005 годах на двух видах грызунов: лабораторные мыши линии ICR (*Mus musculus*) и джунгарские хомячки (*Phodopus sungorus*), различающихся по вероятности внутривидового обмена паразитами. В связи с тем, что индивидуальные участки мышей, как правило, перекрываются, в естественных популяциях данного вида можно ожидать больший обмен паразитами, чем у джунгарских хомячков, которые имеют очень низкую популяционную плотность. Мышей аутбредной линии ICR получали из вивария Института цитологии и генетики СО РАН и из Государственного научно-исследовательского центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» в возрасте двух месяцев и после трех недель передержки в виварии использовали в экспериментах. Лабораторную популяцию джунгарских хомячков поддерживали в Институте систематики и экологии животных СО РАН. В опыты отбирали животных в возрасте 3-6 месяцев. Самцов мышей и всех хомячков содержали по одному в клетке, а самок мышей – в отдельной комнате по четыре особи в клетке.

Животных во время эксперимента содержали при летнем фотопериоде (14С:10Т) Для активации неспецифического звена иммунной системы самцам исследуемых видов вводили бактериальный эндотоксин - липополисахарид (L-4005, *E.coli*, серотип 055:B5, Sigma) в дозе 50 мкг/кг веса тела (0,005 мл на 1 г массы тела). В экспериментах на мышях дополнительно использовали дозу в 1000 мкг/кг, а также проводили эксперимент длительного, ежедневного введения ЛПС, увеличивая дозу каждые два дня от 25 до 1000 мкг/кг. Контрольной группе самцов вводили физиологический раствор - 0,9% NaCl в том же объеме, что и ЛПС. Инъекции осуществляли перед выключением света, в 15 часов.

В течение нескольких дней до и после введения препаратов для оценки степени выраженности синдрома болезни проводили регистрацию спонтанной двигательной активности с помощью инфракрасных датчиков ("Reflex").

Исследования количества выделенного животными углекислого газа осуществляли с помощью газоанализатора (ПЭМ-2М), а также фиксировали уровень потребления пищи. Оборудование и программное обеспечение оценки энергообмена разработаны с.н.с. нашей лаборатории Д.В. Петровским.

В разные сроки после введения растворов у самцов мышей и хомячков брали пробы крови (0,2 мл) и ночные пробы фекалий для определения уровня тестостерона и глюкокортикоидов радиоиммунным (РИА) или иммуноферментным (ИФА) методами анализа.

Исследовательское поведение мышей изучали с помощью тестов подсадки ювенильного интродера (Fishkin, 1997). При этом регистрировали продолжительность поведенческих актов (обнюхивания, преследования, укусы и атаки) взрослых самцов. Тесты проводили до инъекций (0 час) и через 3, 6 и 24 часа после введения ЛПС.

Агрессивность животных исследовали в тесте парного ссаживания на нейтральной территории через 3-4 часа и на пятые сутки после иммуностимуляции. В ходе теста (15 мин) регистрировали агрессивные, пассивно-оборонительные и неагонистические формы поведения. Для приведения характеристики поведения к одному показателю рассчитывали индекс агрессивности (ИА) по формуле:  $ИА = (\text{агрессивные акты} - \text{пассивно-оборонительные акты}) / (\text{сумма всех актов, указанных в числителе})$ .

В качестве проб для ольфакторных тестов использовали загрязненную подстилку из клеток самцов разных экспериментальных групп. Образцы проб собирали за ночь первых и пятых суток после введения растворов. Пробы предоставляли самкам, находящимся в разных стадиях эстрального цикла, попарно (Контроль против ЛПС). Для тестирования самок мышей подстилку доноров помещали в металлических сетчатых контейнерах в разные углы клетки реципиента. В ходе теста (2 мин) фиксировали продолжительность обнюхивания каждого образца. Для изучения запахового предпочтения самок хомячков использовали пластиковый ольфактометр, состоящий из трех отсеков.



В два крайних помещали пробы подстилок от контрольного и антигенстимулированного самцов, в центральный – самку. В течение 10 минут фиксировали время пребывания самки в каждом из отсеков. Ольфакторный выбор оценивали с помощью индекса запаховой привлекательности (ИП), предложенного Kavaliers и Colwell (1995):  $ИП = \frac{\text{время обнюхивания подстилки экспериментального самца}}{\text{сумма времени обнюхивания обоих образцов запаха}}$ .

Половое поведение животных исследовали в первые часы и на пятые сутки после введения растворов. Для этого самок, находящихся в состоянии эструса, подсаживали в клетку самца на 10 минут и регистрировали все исследовательские, половые (садки и интромиссии) и агонистические акты самцов, а также защитные акты самок. Для оценки репродуктивного успеха самцов полученных от них эмбрионов взвешивали на 19-е сутки.

Все поведенческие тесты проводили в темное время суток, при инфракрасном свете и записывали на видеокамеру. Анализ поведенческих тестов проводили с помощью программы, разработанной в.н.с. нашей лаборатории Е.А. Новиковым.

Статистическую обработку результатов оценки влияния антигенной стимуляции на изменение уровня гормонов, индекса привлекательности и агрессивности проводили с помощью многофакторного дисперсионного анализа. При сравнении средних в нормально распределенных выборках использовали критерий наименьшей достоверной разницы (*LSD*-тест) и *t*-критерий Стьюдента. В выборках с ненормальным распределением – *U*-критерий Манна-Уитни и критерий Краскэла-Уоллиса. Для оценки времени исследования подстилки контрольных и антигенстимулированных самцов в ольфакторных тестах использовали метод парных сравнений, *t*-критерий Стьюдента для зависимых выборок. При анализе взаимозависимости показателей рассчитывали линейные и ранговые коэффициенты корреляции (Гланц, 1999).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Влияние стимуляции неспецифического звена иммунной системы на спонтанную двигательную активность, энергообмен и агрессивное поведение самцов

Для активации неспецифической иммунной защиты организма в ответ на введение филогенетически древнего антигена – бактериального эндотоксина характерен комплекс поведенческих реакций, объединяемых понятием синдрома болезненного поведения (Hart, 1984; Kent et al., 1992; Dantzer, 2001). Проявление его у животных заключается в снижении локомоторной активности (Swiergiel et al., 1987), пищевого (Bret-Dibat et al., 1995) и исследовательского (Dunn et al., 1993) поведения. Одним из наиболее надежных критериев для выявления болезненного поведения является реакция антигенстимулированного половозрелого самца на ювенильного интродера, которая, как правило, существенно подавлена в первые часы после введения ЛПС (Fishkin et al., 1997).

В наших экспериментах введение небольшой дозы ЛПС грамотрицательных бактерий вызывало отчетливое подавление исследовательской реакции взрослых самцов мышей по отношению к ювенильным интродерам (самцам в возрасте трех недель) (рис.1) Наряду со снижением общей продолжительности актов исследовательского поведения, мы наблюдали падение количества агрессивных актов через 6 часов после введения эндотоксина ( $Z=1,59$ ;  $p=0,05$ ; односторонний  $U$  - критерий Манна-Уитни). Кроме того, однократное введение ЛПС в дозе 50 мкг/кг вызывало у самцов мышей и хомячков характерное для синдрома болезненного поведения снижение спонтанной двигательной активности. У мышей данный показатель возвращался к исходному уровню на четвертые сутки после введения эндотоксина (рис.2), а у хомячков на вторые сутки. Таким образом, самцы изученных нами видов отличались по поведенческой реакции на введение бактериального эндотоксина: мыши оказались более чувствительными, чем хомячки.

У джунгарских хомячков, помимо снижения двигательной активности, зарегистрировано и снижение потребления корма в острую фазу действия эндотоксина ( $t=4,05$ ;  $p<0,01$ ,  $t$ -тест Стьюдента;  $n=10$ ).

При оценке энергообмена по количеству выделяемого углекислого газа было отмечено снижение этого показателя у самцов мышей после введения ЛПС (рис.2). Восстановление энергообмена происходило на третьи сутки, т.е. раньше, чем восстановление двигательной активности.

Количество выделяемого углекислого газа на единицу активности возрастало после введения ЛПС, как в дневные ( $H=28,1$ ;  $p<0,001$ , критерий Краскэла-Уоллиса), так и в ночные часы ( $H=49,9$ ;  $p<0,001$ ). Таким образом, уровень энерготрат на единицу активности самца мыши при антигенной стимуляции увеличивался (рис.3).

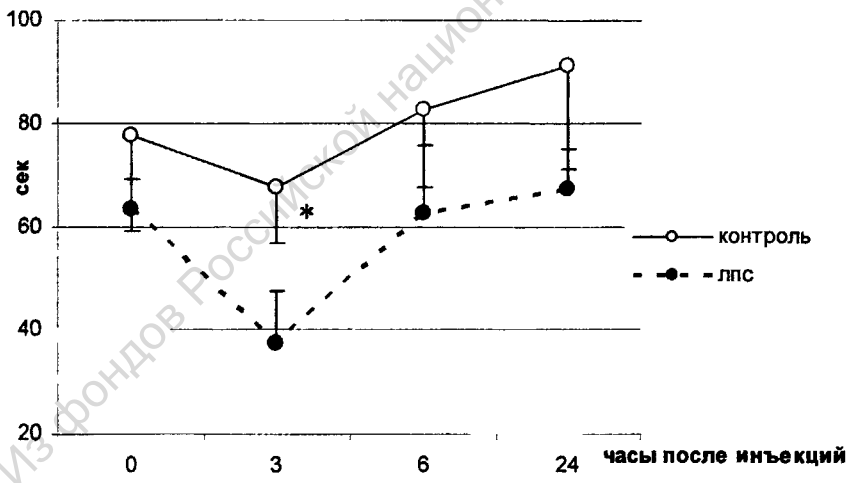


Рис.1. Продолжительность контакта половозрелых самцов мышей с ювенильными интродерами, подсаженными до введения (0 час) и через 3, 6, 24 часа после введения ЛПС (контроль  $n=6$ , ЛПС  $n=4$ )

Примечание: \*- $p=0,05$  уровень значимости различий между группами, односторонний  $U$ -критерий Манна-Уитни,  $Z=1,6$

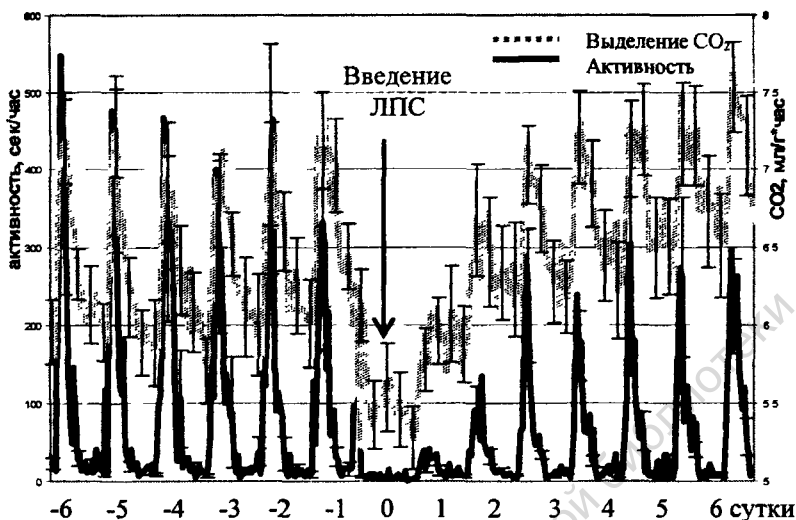


Рис.2. Спонтанная двигательная активность и количество выделяемого  $\text{CO}_2$  самцами мышей при введении ЛПС в дозе 50 мкг/кг ( $n=12$ ). Ошибки средних показаны на графиках выборочно, через каждые 6 часов измерений двигательной активности и выделения  $\text{CO}_2$

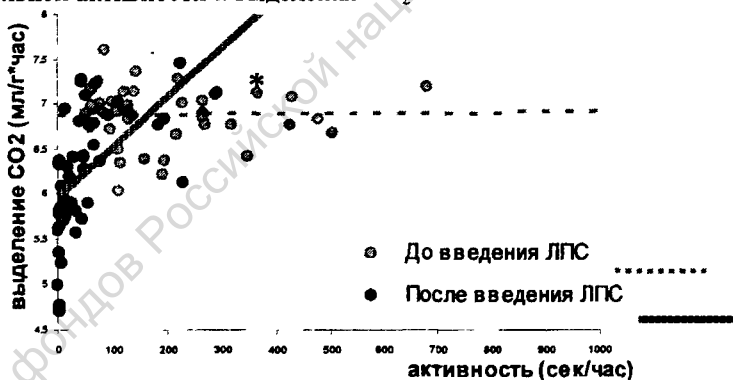


Рис.3. Зависимость выделения углекислого газа от активности самцов мышей в ночные часы. Использованы данные, полученные за 2 суток до введения ЛПС и за 2 суток после введения ЛПС

Уравнения регрессии:

- до введения ЛПС  $\text{CO}_2=6,65+0,0032\pm 0,00395$  ед.активности ( $F=0,2$ ;  $p=0,65$ )

- после введения ЛПС  $\text{CO}_2=5,6+0,052\pm 0,0178$  ед.активности\* ( $F=28,3$ ;  $p<0,001$ )

Примечание:

\*- $p<0,01$  уровень значимости различий по сравнению с коэффициентом регрессии, полученным до введения препарата,  $t=3,21$ ;  $df=22$ ,  $t$ -тест Стьюдента.

### **Влияние антигенной стимуляции иммунной системы на эндокринную функцию коры надпочечников и гонад**

В наших экспериментах при однократном введении разных доз ЛПС самцам мышей наблюдали увеличение базального уровня глюкокортикоидов по сравнению с контролем (при 25 мкг/кг на 7,9 нг/г (контроль  $n=15$ , ЛПС  $n=15$ )  $t=0,7$ ;  $p=0,5$ ; при 50 мкг/кг на 16,7 нг/г (контроль  $n=4$ , ЛПС  $n=4$ )  $t=2,4$ ;  $p<0,05$ ; при 1000 мкг/кг на 42,2 нг/г фекалий (контроль  $n=8$ , ЛПС  $n=8$ )  $t=3,3$ ;  $p<0,01$ ,  $t$ -тест Стьюдента. Увеличение различий между группами с увеличением дозы ЛПС свидетельствовало о том, что прирост концентрации кортикостерона в фекалиях самцов мышей носил дозозависимый характер. К пятым суткам концентрация гормона, вне зависимости от вводимой дозы эндотоксина, возвращалась к контрольному уровню.

У самцов джунгарских хомячков мы не наблюдали достоверного повышения уровня кортизола в фекалиях, собранных за ночь первых суток после введения ЛПС. Вместе с тем, у них отмечен подъем концентрации кортизола в плазме крови через два часа после введения ЛПС ( $t=2,3$ ;  $p<0,05$ ,  $t$ -тест Стьюдента, контроль  $n=5$ , ЛПС  $n=5$ ). Адренокортикальную реакцию на эндотоксин удалось зарегистрировать при сборе фекалий с 3-х часовыми интервалами. При этом достоверное превышение контрольного уровня имело место только через 12 часов после инъекции ( $t=2,1$ ;  $p=0,05$ ,  $t$ -тест Стьюдента,  $df=8$ ). Эти данные свидетельствуют о том, что у хомячков, в отличие от мышей, активация коры надпочечников является кратковременной и не отражается на содержании кортизола в фекалиях, собранных за 12–14 часовой период после инъекции. На пятые сутки концентрация кортизола не различалась между группами антигенстимулированных и контрольных самцов хомячков.

Помимо базального уровня гормонов, в наших экспериментах измеряли содержание глюкокортикоидов в фекалиях и после поведенческих тестов.

При этом изменение показателя было вызвано не только введением антигена ( $F_{1,62}=12,5$ ;  $p<0,01$ ), но и участием в тестах социального поведения ( $F_{2,62}=5,72$ ;  $p<0,01$ ) (табл.1).

Базальная концентрация тестостерона в фекалиях самцов мышей при антигенной стимуляции не отличалась от уровня контрольных животных. Но у джунгарских хомячков в целом (на первые и пятые сутки) отмечено увеличение данного показателя ( $t=1,9$ ;  $p=0,06$ ,  $t$ -тест Стьюдента, контроль  $n=52$ , ЛПС  $n=48$ ).

После тестов социального конфликта у самцов мышей наблюдали снижение уровня гормона, по сравнению с базальным уровнем. После же проведения тестов полового поведения содержание тестостерона у антигенстимулированных самцов не отличалось от базального уровня (табл.2).

### **Влияние антигенной стимуляции иммунной системы**

#### **на социальное поведение самцов**

При исследовании социального поведения самцов мышей обнаружено снижение индекса агрессивности (ИА) в тестах парного ссаживания с контрольными животными в первые сутки после введения эндотоксина (50 мкг/кг:  $Z=2,5$ ,  $p<0,01$ ,  $U$ -критерий Манна-Уитни,  $df=18$ ; 1000 мкг/кг:  $Z=2,7$ ,  $p<0,01$ ,  $df=8$ ). Снижение показателя носит дозозависимый характер. При повторном тестировании на пятые сутки после введения ЛПС и в случае отсутствия опыта социального конфликта, индекс агрессивности не различался между антигенстимулированными и контрольными самцами ( $Z=1,5$ ,  $U$ -критерий Манна-Уитни,  $df=26$  и  $Z=0,7$ ,  $df=18$ , соответственно).

В отличие от мышей, у самцов хомячков не зафиксировано достоверного изменения ИА при тестировании через 3 часа после инъекции эндотоксина ( $Z=0,2$ ,  $U$ -критерий Манна-Уитни,  $df=12$ ). При этом у животных, протестированных в фазу восстановления (5-е сутки после инъекции) наблюдали даже увеличение агрессивности антигенстимулированных самцов ( $Z=2,3$ ,  $p<0,05$ ,  $U$ -критерий Манна-Уитни,  $df=22$ ).

Таблица 1

Уровень кортикостерона (нг/г фекалий) при однократном введении  
бактериального эндотоксина самцам мышей

Доза	День	Условия	Контроль	ЛПС
50 мкг/кг	1	Базальный уровень	55,9±6,21 (n=4)	72,6±3,36 (n=4)*
	5		64,5±7,63 (n=4)	65,8±8,2 (n=4)
	1	Ссаживания с самками	80,8±9,5 (n=5)#	126±27,8 (n=5)
	1	Ссаживания с самцами	51,1±5,01 (n=4)	99,3±16,5 (n=4) *
1000 мкг/кг	1	Базальный уровень	80,6±9,73 (n=8)	122,8±8,06 (n=8) **
	5		81,2±6,6 (n=8)	82,9±8,68 (n=8)
	1	Ссаживания с самками	74,5±7,64 (n=5)	95,4±15,1 (n=5)
	1	Ссаживания с самцами	56,7±6,9 (n=5)#	69,3±5,01 (n=5)#

Примечание: p-уровень значимости различий, t-тест Стьюдента

\*-p<0,05; \*\*-p<0,01, по сравнению с контрольной группой

#-p≤0,05, по сравнению с базальным уровнем в соответствующей группе

Таблица 2

Уровень тестостерона (нг/г фекалий) при однократном введении  
бактериального эндотоксина самцам мышей

Доза	День	Условия	Контроль	ЛПС
50 мкг/кг	1	Базальный уровень	32,7±3,26 (n=4)	40,5±3,7 (n=4)
	5		37,9±3,92 (n=4)	43,2±7,72 (n=4)
	1	Ссаживания с самками	27,2±1,97 (n=5)#	34,4±3,43 (n=5)
	1	Ссаживания с самцами	22,4±1,75 (n=4)##	29,9±2,62 (n=4)#
1000 мкг/кг	1	Базальный уровень	38,5±1,99 (n=8)	46,2±5,94 (n=8)
	5		23,7±1,27 (n=8)	23,5±3,26 (n=8)
	1	Ссаживания с самками	26,2±3,26 (n=5)##	37,8±4,33 (n=5)
	1	Ссаживания с самцами	19,5±2,3 (n=5)##	17,7±2,8 (n=5)##

Примечание: p-уровень значимости различий, t-тест Стьюдента

#-p≤0,05, ##-p≤0,01, по сравнению с базальным уровнем в соответствующей группе

**Влияние антигенной стимуляции иммунной системы  
на хемосигналы самцов**

В наших исследованиях достаточно неожиданным фактом оказалось увеличение времени обнюхивания самками подстилки ЛПС-стимулированных самцов. Индекс ольфакторной привлекательности достоверно превышал таковой контрольных самцов в первые сутки после антигенной стимуляции хомячков ( $t=3,24$ ,  $p<0,01$ ,  $t$ -тест Стьюдента,  $df=50$ ). Для этих хомячков отмечена достоверная корреляция индекса запаховой привлекательности (ИП) с уровнем андрогенов в фекалиях ( $r=0,35$ ;  $p<0,05$ ,  $df=46$ ). У самцов мышей подобное увеличение ИП отмечено на пятые сутки после инъекций (табл.3).

Таблица 3

**Индекс ольфакторной привлекательности (ИП) подстилки  
антигенстимулированных самцов мышей для самок**

Физиологическое состояние самки	Сутки после инъекции	50 мкг/кг n=24	1000 мкг/кг n=8
Эстральные	1	0,55±0,07	0,55±0,06
	5	0,61±0,03**	0,56±0,05
Неэстральные	1	0,46±0,04	0,51±0,07
	5	0,51±0,07	0,65±0,04**

Примечание: p-уровень значимости различий, парный  $t$ -тест Стьюдента  
\*\*- $p<0,01$ , по сравнению с контролем, где величина  $ИП_{(Контроль)}=1-ИП_{(ЛПС)}$

**Влияние антигенной стимуляции иммунной системы  
на половое поведение и репродуктивный успех самцов**

В первые сутки после введения ЛПС у самцов мышей была снижена половая активность, равно как и другие формы поведения. На пятые сутки отмечена большая частота обнюхивания самками ано-генитальной области антигенстимулированных самцов ( $Z=2,4$ ,  $p<0,05$ ,  $U$ -критерий Манна-Уитни,  $n=24$ ), что совпадает с большей ольфакторной привлекательностью их подстилок по сравнению с контролем (см. табл.3).



При одинаковом с контролем проявлении актов агрессии антигенстимулированные самцы вызывали у самок меньшее число ответных пассивно-оборонительных реакций ( $Z=2,1$ ,  $p<0,05$ ,  $U$ -критерий Манна-Уитни,  $n=24$ ). Кроме того, в фазу восстановления после инъекции ЛПС подопытные самцы совершали большее количество садок. Причем, если у контрольных самцов более половины садок наблюдалось непосредственно после преследования самки, то у антигенстимулированных особей садкам предшествовал более широкий спектр поведенческих актов.

Количество фертильных покрытий, оцененных по числу беременных самок, между группами не отличалось. Однако репродуктивный выход оказался достоверно ниже у интактных самок, ссаженных с антигенстимулированными самцами на 5-е сутки после введения ЛПС. Для этой группы характерно снижение массы эмбрионов по сравнению со спаренными с контрольными особями самками ( $1,16\pm 0,038$ г,  $n=54$  и  $1,34\pm 0,037$ г,  $n=45$ , соответственно,  $p<0,01$ ,  $t$ -тест Стьюдента). Эти данные указывают на возможное изменение качества спермы, что может отразиться на условиях эмбрионального развития.

### **Исследования эффектов длительного введения бактериального эндотоксина**

Хемокоммуникационные, эндокринные и поведенческие эффекты длительного воздействия на организм бактериального эндотоксина были проверены нами в эксперименте с ежедневным введением нарастающих доз ЛПС (от 25 до 1000 мкг/кг) самцам мышей. При этом наблюдали развитие адренкортикальной толерантности к эндотоксину, что выражалось в отсутствии стрессового эффекта даже высоких доз ЛПС. Уровень же андрогенов в наших опытах возрастал на фоне регулярного введения ЛПС ( $F_{1,172}=9,15$ ,  $p=0,003$ ).

Запаховая привлекательность антигенстимулированных самцов в данном эксперименте не изменялась для самок в состоянии эструса, но

увеличивалась для неэстральных самок ( $t=4,9$ ;  $p<0,001$ ,  $t$ -тест Стьюдента,  $n=30$ ), что может объясняться повышением уровня тестостерона в образцах фекалий данных особей. При ссаживании с самками, антигенстимулированные самцы по половой активности не отличались от контрольных.

Таким образом, введение ЛПС, вызывающее активацию механизмов неспецифической иммунной защиты, оказывает положительное влияние на сексуальную аттрактивность самцов мышей и хомячков, что подтверждается как ольфакторными тестами, так и прямыми наблюдениями полового поведения самцов. Адаптивный смысл этого эффекта может быть связан с двумя обстоятельствами. Во-первых, активация только неспецифических защитных реакций, за которыми не следуют процессы специфического антителообразования, может служить индикатором высокой эффективности первой линии иммунной защиты, т.е. врожденного иммунитета. Во-вторых, взаимодействие иммунных рецепторов с такими филогенетически древними антигенами, как компоненты бактериальных оболочек, является необходимым условием поддержания физического здоровья и половой активности животных (Shimizu et al., 1998; Rakoff-Nahoum et al., 2004).

Вместе с тем, в наших экспериментах, вопреки более высокой половой привлекательности, самцы мышей, чья иммунная система была стимулирована ЛПС, имеют меньший репродуктивный выход по сравнению с контролем. Из этого следует, что для формирования достоверной информации о репродуктивных качествах инфицированного самца требуется комплексное участие и тимус-зависимых, и тимус-независимых антигенов, входящих в состав различных паразитических организмов. При этом антигены, стимулирующие специфический иммунитет, снижают привлекательность хемосигналов (Moshkin et al., 2001, 2002), а введение антигенов, адресованных преимущественно к врожденному иммунитету, приводит к снижению социальной конкурентоспособности самцов. И только вместе они воспроизводят поведенческие и хемокоммуникационные эффекты заражения.

## ВЫВОДЫ

1. В первые сутки после введения бактериального эндотоксина у исследуемых видов животных наблюдается комплекс поведенческих изменений, характерный для синдрома болезненного поведения. Снижение двигательной активности в острой фазе действия ЛПС сочетается с падением энергообмена. Вместе с тем, затраты энергии на единицу активности существенно превосходят таковые у контрольных животных. Показатели активности и энергообмена восстанавливаются у хомячков быстрее, чем у мышей.

2. Однократное введение ЛПС приводит к дозозависимому повышению концентрации глюкокортикоидов в фекалиях, которая возвращается к исходному уровню в фазу восстановления. Базальная концентрация андрогенов не снижается у самцов мышей и даже повышается у самцов джунгарских хомячков.

3. В первые часы после введения эндотоксина способность к доминированию в условиях социального конфликта снижается у антигенстимулированных самцов мышей и не изменяется у самцов джунгарских хомячков. Для самцов мышей отмечено восстановление социальной конкурентоспособности на пятые сутки после введения эндотоксина. ЛПС-стимулированные самцы джунгарских хомячков, не имевшие опыта социального конфликта в острой фазе действия эндотоксина, демонстрируют большую способность к доминированию при конкуренции с контрольными особями.

4. У самцов обоих видов введение ЛПС приводит к повышению запаховой привлекательности для самок. При этом самки джунгарских хомячков больше времени проводят в отсеках с ольфакторными пробами самцов, собранных в первые сутки после введения им эндотоксина. Самки мышей предпочитают запах подстилки самцов, собранной на пятые сутки после инъекций ЛПС. В тестах полового поведения эстральные самки мышей проявляют больший исследовательский интерес (назо-генитальные обнюхивания) по отношению к антигенстимулированным самцам.

5. При равном количестве агрессивных актов у контрольных и антигенстимулированных самцов мышей, направленных против половых партнеров, самки демонстрируют больше защитных действий по отношению к контрольным самцам, чем к самцам, которым вводили ЛПС за 5 дней до теста. Полученные от антигенстимулированных самцов эмбрионы имеют меньшую массу тела, чем потомки контрольных самцов.

6. При многократном введении эндотоксина отмечается развитие нейроэндокринной и поведенческой толерантности к препарату, что выражается в отсутствии адренокортикальной активации и в одинаковой конкурентоспособности животных обеих групп. Ольфакторная привлекательность самцов при хроническом введении ЛПС достоверно выше для неэстральных самок.

## Публикации по теме диссертации

1. **Кондратюк Е.Ю.**, Новиков Е.А., Петровский Д.В. Поведенческие, ольфакторные и эндокринные эффекты бактериального эндотоксина у джунгарских хомячков//IV съезд физиологов Сибири.- Новосибирск, 2002.- С. 129
2. **Kondratyuk E.Y.** Behavioral, olfactory and endocrine effects of bacterial endotoxin in dwarf hamsters (*Phodopus sungorus*)//4<sup>th</sup> International symposium on physiology and behaviour of wild and zoo animals.- Berlin, 2002.- P.47
3. Новиков Е.А., Петровский Д.В., **Кондратюк Е.Ю.**, Литвинова Е.А., Мошкин М.П. Поведение самцов джунгарского хомячка (*Phodopus sungorus*, *Rodenta*, *Muridae*) при прямом или ольфакторном контактах с антигенстимулированными особями//Зоологический журнал.- 2004; 83 (2).- С. 486-492
4. **Kondratuk K.** Behavioral, chemosignal and endocrine effects of bacterial endotoxins in male mice//5<sup>th</sup> International symposium on physiology and behaviour of wild and zoo animals.- Berlin, 2004.- P.60
5. **Kondratyuk E.**, Litvinova E., Novikov E., Petrovski D., Kolosova I., Moshkin M. Endocrine status and scent attractiveness in males of dwarf hamster (*Phodopus sungorus*) injected with T-dependent and T-independent antigens//Acta Zoologica Sinica.- 2004; 50(5).- P. 714-722
6. **Kondratyuk E.Y.** Stimulation of innate immunity by bacterial endotoxin modifies aggressiveness and scent attractiveness in male dwarf hamsters (*Phodopus sungorus*)//XXIX International ethological conference.- Budapest, 2005 (*In press*).

Автор выражает благодарность, в первую очередь, научному руководителю, учителю и наставнику, профессору, д.б.н. Михаилу Павловичу Мошкину, а также сотрудникам лаборатории: Д.В. Петровскому и Е.А. Новикову за помощь в обработке данных по спонтанной двигательной активности, энергообмену и социальному поведению животных, И.Е. Колосовой за помощь в измерении гормонов, Е.А. Литвиновой и студентам КемГУ: Л.А. Саваль, А.Е. Акулову, Ю.В. Фроловой за помощь в проведении дополнительных экспериментов.

Членам своей семьи за понимание и поддержку при написании и защите работы.

Из фондов Российской национальной библиотеки

**№ 19 193**

РНБ Русский фонд

2006-4

17164

Из фондов Российской национальной библиотеки