

На правах рукописи

МЕЛЬНИК Светлана Анатольевна

**ЭНДОКРИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ САМЦОВ МЫШЕЙ**

03.00.13 – физиология

Автореферат

Диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Нижний Новгород

2007

Работа выполнена на кафедре зоологии и кафедре физиологии и биохимии человека и животных Нижегородского государственного университета им. Лобачевского

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор Ольга Семеновна Гладышева

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор Ольга Вениаминовна Бирюкова

доктор биологических наук,
Алексей Васильевич Суров

Ведущая организация: Нижегородский государственный
педагогический университет

Защита состоится « 23 » мая 2007г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета К.212.166.15 Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского по адресу: 60395, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, корп. 1, биологический факультет.
Факс: (8312) 65-85-92

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Автореферат разослан «21» апреля 2007г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

А.С. Корягин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Обоняние играет ключевую роль в запуске и формировании различных форм поведения животных: полового, пищевого, агрессивного, исследовательского, территориального и т.д. В процессе хемокоммуникации важное значение имеют запахи, сигнализирующие о гормональном статусе животного, его иерархическом положении и т.д., что важно для видов, образующих сложные социальные сообщества (Соколов и др., 1989). Лабораторные мыши, являющиеся разновидностью вида *Mus musculus*, являются привлекательным объектом для исследований из-за того, что для них описан целый ряд химических соединений, которые содержатся в моче этих животных и участвуют в запуске некоторых форм поведения (Соколов и др., 1979), среди этих соединений – изовалериановая кислота (ИВК) (Зинкевич, Курятов, 1979), которая также обнаружена и в вагинальных выделениях у самок этого вида (Новиков, 1988).

Важно отметить, что в поведенческих работах, выполненных на самках и самцах как линейных, так и беспородных мышей было продемонстрировано, что запах этого соединения в очень низких концентрациях может привлекать самок и самцов этого вида, а повышение его концентрации приводит к репеллентному эффекту (Гладышева и др., 1992). Обнаружена зависимость этого эффекта у мышей от различных состояний у самок (Гладышева и др., 1992; Борякова, 2003) и у самцов (Гладышева и др., 1997), которые определяются изменениями в содержании, как эстрогенов, так и андрогенов. Существование тесной взаимосвязи между обонятельной чувствительностью и уровнем половых гормонов с одной стороны, а также неясность в понимании физиологических механизмов этого явления с другой стороны и важность этих представлений для понимания целого ряда нарушений, например специфических аносмий и т.п. как у животных (Новиков и др., 2002), так и у человека определяет актуальность наших исследований.

Цель и основные задачи исследования. Целью работы явилось изучение динамики обонятельной чувствительности к запаху ИВК у самцов лабораторных мышей в зависимости от уровня половых гормонов в их организме при использовании различных экспериментальных моделей.

В исследовании были поставлены следующие задачи:

- проследить возрастные изменения порогов чувствительности к запаху ИВК у самцов лабораторных мышей
- исследовать влияние уровня половых гормонов в крови на изменение порогов чувствительности к запаху ИВК у половозрелых самцов
- проанализировать наличие связи между порогом чувствительности к запаху ИВК у половозрелых самцов мышей и целым рядом андрогензависимых характеристик
- исследовать влияние других факторов, модулирующих изменения в обонятельной чувствительности к запаху ИВК у самцов мышей

Научная новизна исследований. Использование условнорефлекторного метода исследования порогов обонятельной чувствительности к запаху ИВК позволило впервые установить наличие половых различий в рецепции этого запаха у самцов мышей по сравнению с самками. Искусственное изменение у самцов мышей уровня половых гормонов в крови (кастрация, кастрация с последующей тестостеронотерапией, введение тестостерона интактным животным) позволило впервые выявить характер гормонального влияния на периферическую обонятельную чувствительность к запаху ИВК. Впервые обнаружены корреляционные связи между уровнем обонятельной чувствительности и такой андрогензависимой характеристикой как агрессивность самцов. Кроме того, установлена взаимосвязь размеров обонятельных луковиц с размерами семенников.

Впервые продемонстрировано, что значительное модулирующее влияние на пороги к запаху ИВК оказывает предварительная экспозиция животных в „атмосфере” этого запаха, а также, что значительное увеличение чувствительности к ИВК наблюдается, если в этот момент идет интенсивное

восстановление обонятельных рецепторных клеток после экспериментально вызванной аносмии.

Научно-теоретическое и практическое значение работы. Результаты работы позволяют дополнить и сформулировать новые представления о направленности влияний, осуществляемых на обонятельную чувствительность половыми гормонами, которые действуют на уровне обонятельных рецепторах. Выявленная разница в порогах чувствительности к запаху ИВК между самцами и самками, может быть основанием для отнесения запаха ИВК к фрагменту сигнала, определяющего принадлежность к полу.

Полученные нами результаты с использованием целого ряда экспериментальных моделей на лабораторных грызунах могут быть использованы для объяснения ряда феноменов в ветеринарии и медицине. Кроме того, данные результаты могут быть включены в различные спецкурсы по этологии и химической коммуникации животных.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Уровень пороговой чувствительности к запаху ИВК у самцов мышей выше, чем у самок.
- Обонятельная чувствительность самцов лабораторных мышей к запаху ИВК снижается с возрастом, при том, что максимальная чувствительность к этому запаху наблюдается у неполовозрелых особей.
- Искусственное изменение уровня половых гормонов в крови приводит к изменению порогов обонятельной чувствительности к запаху ИВК, кастрация самцов снижает, а введение тестостерона – увеличивает чувствительность к этому запаху.
- Величины обонятельных порогов чувствительности к запаху ИВК коррелируют с такими андрогензависимыми характеристиками самцов лабораторных мышей как их агрессивность, весом их семенников и рядом других морфометрических параметров.
- Предварительное выдерживание самцов мышей в „атмосфере” запаха ИВК приводит к увеличению обонятельной чувствительности к этому веществу.

Апробация работы. Результаты проведенных исследований докладывались на XIII конгрессе Европейской Организации Исследователей Хеморецепции – ECRO (Siena, 1998), международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов» (Москва, 2000), международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодая наука – XXI веку» (Иваново, 2001), 4-й Пущинской конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2001), международной научно-практической конференции молодых ученых «Современные проблемы естествознания» (Владимир, 2001), XXVII съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Казань, 2001), международной конференции «Проблемы популяционной экологии животных», посвященной памяти академика И.А. Шилова (Томск, 2006).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 работ, 1 в зарубежном издании, 3 в изданиях, рекомендованных в списке ВАК.

Объем и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, списка используемой литературы и приложения. Работа изложена на страницах, содержит таблиц, рисунка. Список использованной литературы включает отечественных и зарубежных источника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вырабатывание условного рефлекса. Пороги обонятельной чувствительности у самцов лабораторных мышей оценивали с помощью методики вырабатывания условного рефлекса избегания запаха на основе использования питьевой депривации (Борякова, 2003). Значения порогов чувствительности к запаху ИВК в работе представлены в виде десятичных логарифмов концентраций этого соединения, которые различались животными.

Изменения в порогах обонятельной чувствительности наблюдали у самцов мышей в различные возрастные периоды. Были использованы следующие возрастные группы: неполовозрелые самцы, 4-, 5-, 6- и 7-месячные животные. Каждая группа включала по 10 особей.

Влияние половых гормонов на изменение обонятельной чувствительности к запаху ИВК у самцов мышей исследовали в модельных экспериментах с использованием кастрации (10 особей), которую осуществляли по общепринятой методике (Киршенблат, 1969), а также в опытах с введением тестостерона кастрированным и интактным животным (группы по 10 особей).

Морфометрические исследования. Световые морфометрические исследования проводили на тотальных срезах основного обонятельного органа самцов мышей в опытах с кастрацией и введением тестостерона (группы по 10 особей). В качестве морфометрических характеристик использовали высоту обонятельного эпителия и число рядов ядер клеток (Гладышева и др., 1988). Тотальные гистологические препараты готовились с использованием метода Дженкинса (Лилли, 1969).

В ряде серий опытов проводили измерения целого ряда морфометрических показателей, таких как длина тела, вес тела, аногенитальное расстояние (Drickamer et al., 1995), вес семенников, вес головного мозга и вес обонятельных луковиц.

Определение агрессивности. В серии опытов совмещали измерение порогов обонятельной чувствительности к ИВК с определением уровня агрессивности самцов (30 особей) с помощью модели внутривидовой межсамцовой агрессии (Пошивалов, 1986). Оценочным критерием агрессивности служило количество атак в 10-минутном тесте.

Выдерживание в запаховой атмосфере. Для проведения этой серии экспериментов половозрелые животные предварительно выдерживались в течение 5–7 недель в „атмосфере” запаха ИВК или камфары (Борякова, 2003). Пороги чувствительности к ИВК измеряли до начала эксперимента, и после помещения животных в „атмосферу” запаха еженедельно. Были использованы следующие группы: интактные самцы в возрасте 2-х и 6-ти месяцев, предварительно выдержанные в „атмосфере” запаха ИВК, интактные самцы в возрасте 2 месяцев, содержащиеся в стандартных условиях, интактные самцы в возрасте 2 месяцев, предварительно выдержанные в „атмосфере” запаха камфары,

две группы 2-х месячных самцов, подвергнутых экспериментальной anosмии по стандартной методике (Троицкая, Гладышева, 1987), одна из которых выдерживалась в „атмосфере” запаха камфары. Каждая группа состояла из 10 особей. Неполовозрелые самцы (20 особей) помещались в атмосферу запаха ИВК сразу же после их рождения. Определение обонятельных порогов к ИВК проводили в возрасте до пяти недель. Контролем служили интактные особи той же возрастной группы.

Статистическая обработка полученных результатов. Полученные результаты обрабатывались с использованием компьютерной программы „Биостатистика”. В зависимости от объема исследуемой группы, применяли параметрические или непараметрические тесты. Достоверность различий двух выборок определяли по критерию Стьюдента или критерию Уилкоксона. В случае множественного сравнения вносилась поправка Бонферрони и поправка Данна (Гланц, 1999). Корреляционный анализ проводился с использованием коэффициента корреляции Пирсона и рангового коэффициента Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние изменений естественного уровня половых гормонов на обонятельную чувствительность самцов мышей к запаху ИВК (возрастная модель). Измерения у самцов лабораторных мышей в возрасте 4 месяцев показали, что обонятельные пороги чувствительности к запаху ИВК находятся в диапазоне концентраций $10^{-8,4}$ – $10^{-7,9}$ моль/л, а средний порог составляет $10^{-8,15 \pm 0,063}$ моль/л. Обонятельная чувствительность к ИВК у самцов значительно превышает таковой показатель у самок этого вида: среднее значение порога у 4-х месячных самок в стадии проэструса составляет $10^{-7,01 \pm 0,018}$ моль/л (Борякова, 2003).

Дальнейшие измерения обонятельных порогов у самцов в возрасте 5, 6 и 7 месяцев показали снижение чувствительности к запаху ИВК. У самцов в возрасте 5-ти месяцев среднее значение порога составило $10^{-8,11 \pm 0,067}$ моль/л, у шести- и семимесячных – $10^{-8,08 \pm 0,065}$ и $10^{-7,96 \pm 0,068}$ моль/л соответственно (рис. 1).

Аналогичная картина возрастных изменений обонятельной чувствительности наблюдается и у самок этого вида (Борякова, 2003). Повышение порогов чувствительности к запаху ИВК, которое отмечено нами у животных со сниженной репродукцией (старых), очевидно, связано с дегенеративными изменениями в обонятельном эпителии, которые были обнаружены при снижении продукции половых стероидов в этот возрастной период и отражаются на электрофизиологических показателях работы обонятельных рецепторов (Гладышева, Троицкая, 1989).

Особая картина наблюдается у неполовозрелых животных (в возрасте до пяти недель). Измерения у одномесячных животных показали, что пороги чувствительности к запаху ИВК находятся в диапазоне концентраций $10^{-9,2}$ – $10^{-8,6}$ моль/л, а средний порог составляет $10^{-8,96 \pm 0,077}$ моль/л (рис. 1). Обонятельная чувствительность неполовозрелых самок также выше, чем у взрослых (Борякова, 2003). Эти результаты совпадают с электрофизиологическими данными (Гладышева, Троицкая, 1989), полученными при отведении ответов от обонятельного эпителия мышей на стимуляции запахом различных концентраций ИВК.

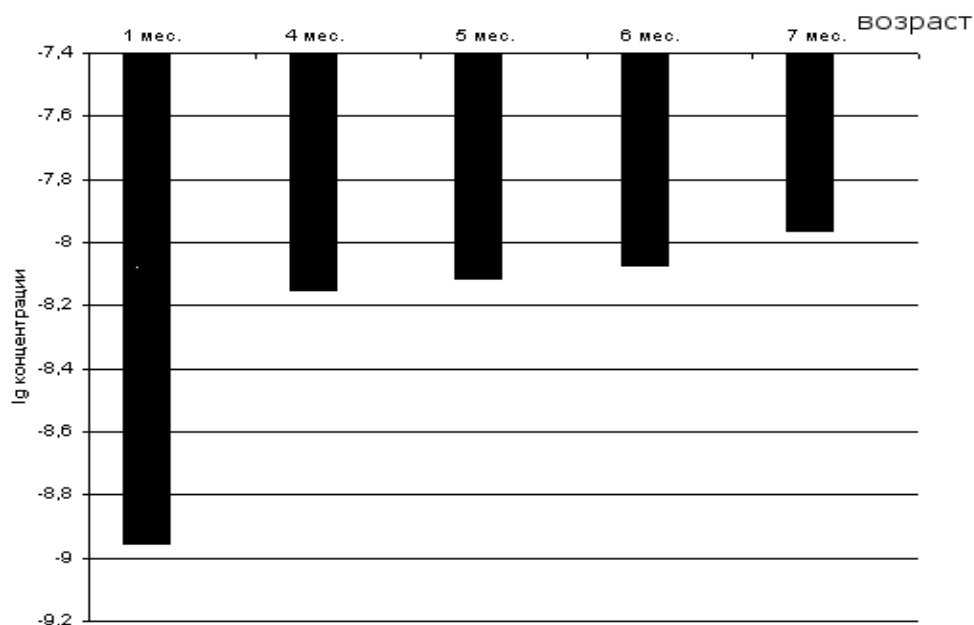


Рис. 1. Величины обонятельных порогов чувствительности к запаху ИВК самцов лабораторных мышей в разные возрастные периоды.

2. Влияние гонадоэктомии на изменение обонятельных порогов чувствительности к запаху ИВК у половозрелых самцов мышей. Для уточнения характера влияния половых гормонов на изменения чувствительности к запаху ИВК нами была использована экспериментальная модель кастрации половозрелых самцов. Самцы мышей в возрасте 2 месяцев были поделены на три группы. Первую группу составляли контрольные животные, у которых измеряли пороги чувствительности в течение всего эксперимента. Вторая группа – подвергшиеся кастрации животные. Третью группу составляли кастрированные самцы, которым, начиная с пятой недели до 4 месяцев, вводили тестостерон пропионат.

Измерения обонятельных порогов к запаху ИВК показали, что у кастрированных животных по сравнению с интактными наблюдается снижение чувствительности к этому запаху (рис. 2).

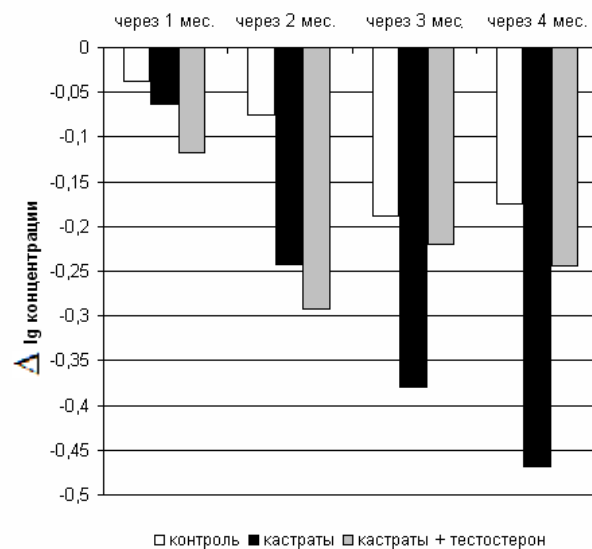


Рис. 2. Влияние гонадоэктомии и введения тестостерона на величины изменений обонятельных порогов восприятия ИВК (по сравнению с порогом до операции).

Δ Ig концентрации – разница между порогом, различаемым животными в норме и животных экспериментальных групп.

Эти результаты полностью совпадают с данными электрофизиологических исследований обонятельного эпителия у 2-х месячных кастрированных самцов, (Гладышева, Троицкая, 1988). Эти же авторы отмечали в поведенческих экспериментах, что через 2 месяца после кастрации исчезали и аттрактивные, и репеллентные свойства запаха ИВК (Gladysheva et al., 1995). Заместительная тестостеронотерапия кастрированных животных замедляет снижение обонятельной чувствительности к запаху ИВК (рис. 2).

2.1. Влияние гонадоэктомии на морфометрические характеристики обонятельного эпителия. Измерения высоты обонятельного эпителия и числа рядов клеточных ядер, которые характеризуют плотность рецепторных элементов, показали значительные изменения этих параметров у кастрированных животных через четыре месяца после гонадоэктомии по сравнению с интактными. Высота обонятельного эпителия снизилась приблизительно в 2,7 раза. Если у самцов контрольной группы высота обонятельного эпителия составляла $68,6 \pm 1,00$ мкм, то у 4-х месячных кастратов этот параметр был равен $25,0 \pm 0,60$ мкм. Число рядов ядер у интактных животных в среднем составляет $9,4 \pm 0,52$, тогда как у кастрированных мышей – $4,6 \pm 0,15$. Исследование этих же параметров у особей, которым через месяц после гонадоэктомии начинали вводить тестостерон, показали, что его введение частично нейтрализует последствия кастрации. Характеристики обонятельного эпителия у этих животных после тестостеронотерапии по своим значениям занимают промежуточное положение: высота обонятельного эпителия равняется $44,0 \pm 0,60$ мкм, а среднее число рядов ядер составляет $7,1 \pm 0,11$.

Таким образом, более длительные сроки после кастрации значительно усиливают деструктивные изменения в обонятельном эпителии по сравнению с таковыми, наблюдаемыми у 2-х месячных кастратов (Гладышева и др., 1988). Тестостеронотерапия способствует восстановлению структурных характеристик обонятельного эпителия, однако при этом не достигается полного эффекта. Одной из причин этого может быть неполное восполнение уровня гормона вводимой дозой.

Известно, что половые стероиды имеют отношение, как к клеточному обновлению, так и к процессу дифференцировки клеток (Епифанова, 1965). Можно предположить, что обнаруженное нами снижение обонятельной чувствительности к запаху ИВК у самцов лабораторных мышей является результатом прямого воздействия андрогенов на обонятельный эпителий.

2.2. Влияние введения тестостерона на обонятельную чувствительность интактных самцов мышей. Экспериментально вызванный дефицит тестостерона у самцов мышей после кастрации оказывает деструктивный эффект на состояние обонятельных рецепторов, что приводит к значительному снижению чувствительности у этих животных к запаху ИВК. В следующей серии экспериментов нами изучалось влияние введения тестостерона на обонятельную чувствительность у интактных особей. Исследования проводили на половозрелых самцах мышей в возрасте 4 месяцев. Определенные нами обонятельные пороги чувствительности к запаху ИВК в начале эксперимента у опытных и контрольных животных были в пределах от $10^{-8,1}$ моль/л до $10^{-8,9}$ моль/л, а средний порог чувствительности к ИВК составил $10^{-8,41 \pm 0,09}$ моль/л. Введение тестостерона в течение 10 недель показало, что у экспериментальных животных наблюдается достоверное снижение порогов чувствительности к ИВК ($P < 0,05$) (рис. 3), по сравнению с контрольными животными.

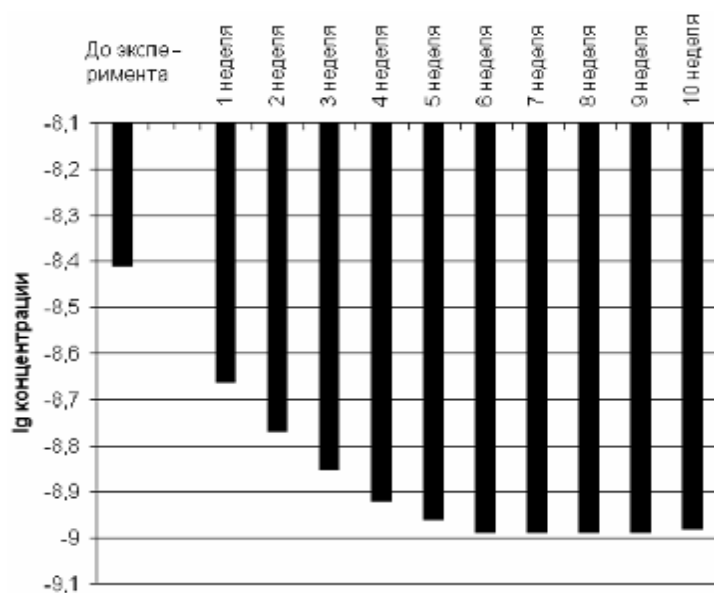


Рис. 3. Изменение обонятельных порогов чувствительности к запаху ИВК интактных самцов лабораторных мышей после введения тестостерона.

Далее обонятельная чувствительность к ИВК продолжает увеличиваться до срока измерений в шесть недель. Затем пороги чувствительности к запаху ИВК стабилизируются на определенном уровне, достигая при этом разницы практически на порядок по отношению к первому измерению (рис. 3).

Таким образом, результаты этих экспериментов показали, что у интактных самцов их обонятельная чувствительность к запаху ИВК увеличивается после введения тестостерона. Учитывая возраст экспериментальных животных, соответствующий началу процесса старения, фактически наблюдается эффект возвращения уровня обонятельной чувствительности к ИВК, характерного для более молодых животных (рис. 1).

2.3. Исследование взаимосвязи между обонятельной чувствительностью к запаху ИВК у самцов мышей и андрогензависимыми показателями. В предшествующих сериях экспериментов было установлено, что уровень тестостерона у исследуемых самцов влияет на пороги обонятельной чувствительности к запаху ИВК. В следующей серии экспериментов были проведены исследования взаимосвязи между обонятельными порогами чувствительности к запаху ИВК и некоторыми андрогензависимыми показателями такими, как уровень агрессивности самцов, который как известно напрямую связан с продукцией тестостерона (Пошивалов, 1986), а также с некоторыми морфометрическими показателями: длина тела (L), аногенитальное расстояние (I) и их соотношение (I/L). Известно, что эти параметры также характеризуют уровень продукции андрогенов у самцов (Drickamer, 1992).

Определение коэффициентов корреляции показало достоверное соответствие ($P < 0,05$) между уровнем обонятельной чувствительности самцов мышей (группа из 20 особей в возрасте 4 месяцев) к запаху ИВК и их размерами аногенитального расстояния и соотношением I/L (коэффициенты корреляции составляют -0,81 и -0,73 соответственно). Величина порогов чувствительности к запаху ИВК также коррелирует ($P < 0,05$) с суммарным числом атак у самцов в ходе теста (коэффициент равен -0,48).

Ранг у неполовозрелых самцов мышей можно определить только по размерам тела (Башенина, 1975). Полученные нами на 10 неполовозрелых самцах результаты демонстрируют сходство с данными исследования для взрослых самцов ($P < 0,05$). В обеих возрастных группах существует корреляция между обонятельной чувствительностью к ИВК и их аногенитальным размером, как абсолютным (коэффициент корреляции у неполовозрелых самцов равен $-0,58$), так и относительным (коэффициент корреляции у неполовозрелых животных составляет $-0,8$).

Таким образом, как и в предшествующих экспериментах с изменением уровня тестостерона (кастрация, кастрация с последующим введением тестостерона, введение тестостерона интактным животным), так и при измерениях косвенных его показателей (агрессивность, размеры и т.д.) выявлена прямая корреляция между величиной обонятельной чувствительности у самцов мышей к запаху ИВК и андрогензависимыми параметрами.

В дальнейших сериях экспериментов на 40 половозрелых самцах мышей в возрасте 4 месяцев были расширены исследования корреляции между такими морфометрическими показателями как длина тела (L), аногенитальное расстояние (l), вес тела (M), вес головного мозга (M_M), вес обонятельных луковиц (M_{OL}), вес семенников (M_C). Полученные результаты показали наличие положительной достоверной корреляцией между этими морфометрическими показателями. Наиболее интересно отметить взаимосвязь между такими показателями как вес семенников и вес головного мозга (коэффициент корреляции составляет $0,33$ ($P < 0,05$)), а также вес семенников и вес обонятельных луковиц (коэффициент корреляции составляет $0,28$ ($P \leq 0,05$)). При переходе к сравнению индексов соответствующих параметров изучаемых структур значение коэффициентов корреляции значительно увеличивается. Так, коэффициент корреляции между индексом семенников (M_C/M) и индексом головного мозга (M_M/M) составляет $0,49$, а между индексом семенников (M_C/M) и индексом обонятельных луковиц (M_{OB}/M) – $0,45$. Таким образом, полученные результаты демонстрируют

зависимость размеров структур центрального отдела обонятельного анализатора от такого андрогензависимого параметра как размеры семенников.

3. Влияние предварительной экспозиции в „атмосфере” запаха ИВК на обонятельную чувствительность самцов мышей. Проведенные нами исследования показали, что обонятельная чувствительность у самцов мышей зависит от уровня андрогенов в крови. Однако обнаруженный факт более высокой чувствительности к запаху ИВК у неполовозрелых животных, содержание тестостерона у которых ниже, чем у взрослых, вносит противоречия в объяснения полученных нами результатов. Для исследования и понимания природы этого явления были предприняты эксперименты, в которых использовали предварительное выдерживание самцов мышей различных возрастных групп в „атмосфере” запаха ИВК, моделируя запаховые условия гнезда.

Две группы интактных мышей в возрасте 2 и 6 месяцев после определения обонятельных порогов чувствительности к запаху ИВК были помещены в боксы, с поддержанием „атмосферы” этого запаха в течение 5 недель. Тестирование каждой группы проводили через каждые семь дней в течение всего срока экспозиции. Контрольная группа животных этого же возраста содержалась в обычных условиях. Постоянное нахождение самцов мышей в „атмосфере” ИВК сопровождалось снижением порогов их обонятельной чувствительности к этому запаху (рис. 4). Характер наблюдаемых нами изменений был сходен в обеих возрастных группах. Достоверное снижение обонятельных порогов чувствительности к запаху ИВК ($P < 0,01$) происходит в течение 4-х недель, причем максимальное снижение наблюдается на первой неделе. Далее процесс замедляется, а затем останавливается.

Далее было исследовано влияние предварительной экспозиции в „запаховой атмосфере” ИВК различной концентрации на изменение чувствительности к этому запаху у неполовозрелых самцов. Оказалось, что обонятельная чувствительность к запаху ИВК у неполовозрелых самцов мышей, которые содержались с момента рождения в „атмосфере” ИВК в концентрации 10^{-3} моль/л, на порядок выше, чем у контрольных неполовозрелых животных.

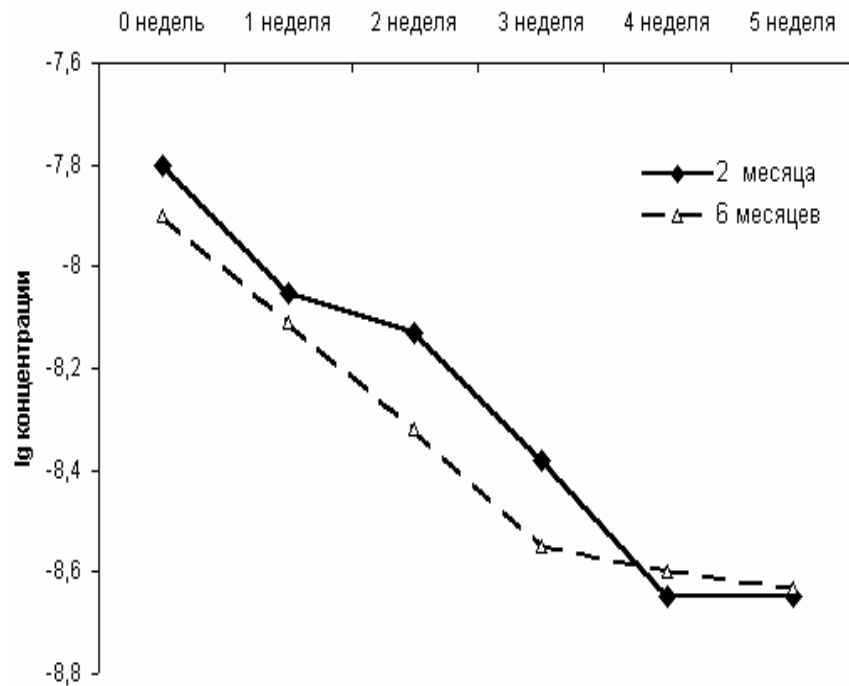


Рис. 4. Изменение обонятельных порогов восприятия ИВК у интактных мышей в возрасте 2 и 6 месяцев, предварительно содержащихся в „атмосфере” запаха ИВК.

Если среднее значение порогов чувствительности к запаху ИВК в контрольной группе составило $10^{-8,72 \pm 0,05}$ моль/л, то в экспериментальной – $10^{-9,46 \pm 0,02}$ моль/л. При экспозиции неполовозрелых животных в „атмосфере” с более низкой концентрацией ИВК (10^{-6} моль/л) среднее значение порогов чувствительности к ИВК отличалось незначительно и составило $10^{-9,11 \pm 0,01}$ моль/л.

Полученные нами результаты, свидетельствующие о стимулирующем эффекте постоянно присутствующего запаха ИВК на обонятельную чувствительность, как у половозрелых, так и у неполовозрелых мышей, могут объяснять феномен этого явления у неполовозрелых мышей запаховым импринтингом.

При использовании многократной предварительной экспозиции половозрелых самцов в „атмосфере” запаха ИВК были получены сходные результаты опытов, которые показали, что при первом выдерживании самцов их обонятельная чувствительность к ИВК повышается в течение первых 4-5 недель, а

затем, в течение 5-6 недели пороги чувствительности к ИВК не изменяются. После 1,5-го месячного перерыва и повторной экспозиции в „запаховой атмосфере” пороги чувствительности к ИВК незначительно увеличились, но эти изменения не были достоверными ($P > 0.05$), что свидетельствует в пользу однократности наблюдаемых изменений.

3.1. Влияние предварительной экспозиции в запаховой атмосфере на восстановление обонятельных порогов у самцов мышей после экспериментальной аносмии. Для понимания физиологических механизмов, которые могут лежать в основе повышения чувствительности к запаху ИВК у неполовозрелых мышей, важно было оценить вклад такого процесса как нейрогенез. С этой целью были проведены опыты с использованием модели экспериментальной аносмии (Троицкая, Гладышева, 1987). В качестве запахового стимула в этом случае нами был выбран нейтральный запах камфары. В опыте использовались 3 группы животных: контрольная (И+К) и две группы, носовые полости которых обработали 1%-ым раствором сульфата цинка (Ц+К) и (Ц). В дальнейшем самцы из групп (И+К) и (Ц+К) подверглись предварительной экспозиции в „атмосфере” запаха камфары, а мыши из группы (Ц) содержались в стандартных условиях и служили контролем. Пороги к запаху камфары определяли каждую неделю в течение 5 недель. Полученные данные сравнивались между группами и с величинами первых измерений, проведенных перед началом эксперимента.

В группе (И+К) уже первое после помещения в „атмосферу” запаха камфары тестирование показало достоверное увеличение обонятельной чувствительности ($P < 0,05$), которое продолжалось в течение всего срока эксперимента, достигнув изменений на порядок (рис. 5б). Тестирование мышей из группы (Ц), сразу после манипуляции, продемонстрировало, что они сначала полностью утрачивали способность к рецепции запаха камфары, а затем к началу 2-ой недели восстанавливали ее на уровне значений порогов, соответствующих началу измерений, до воздействия сульфатом цинка (рис. 5а). У самцов мышей из группы (Ц+К) к началу второй недели эксперимента обонятельная

чувствительность к камфаре была уже на порядок выше ($P < 0,05$), а в последующие недели измерений наблюдалось существенное снижение порогов к запаху камфары, которое достигало двух порядков ($P < 0,001$) и составляло 10^{-6} против 10^{-4} моль/л от момента начала опыта (рис. 5в).

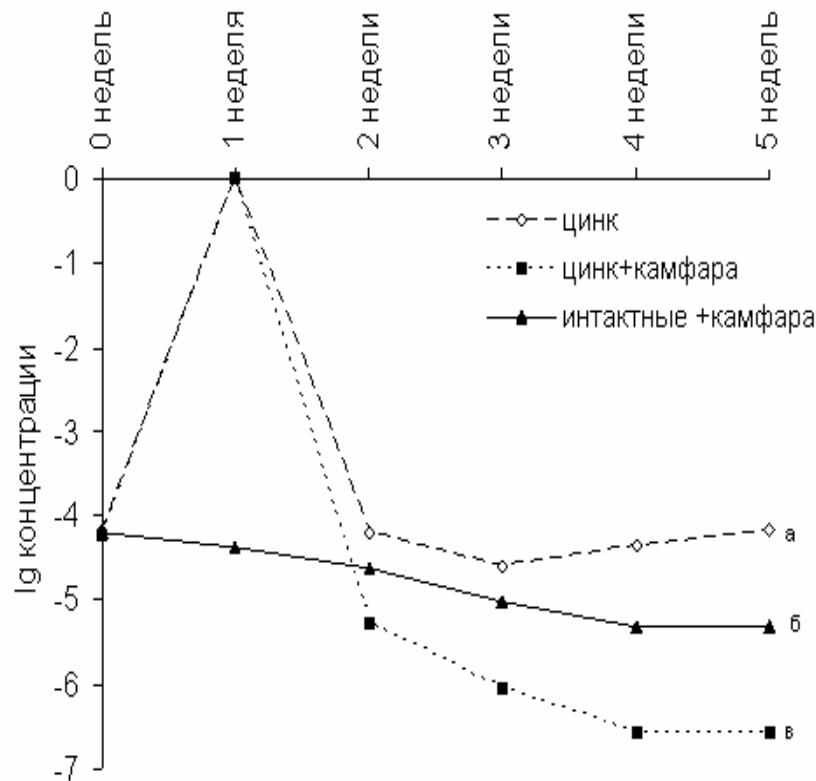


Рис. 5. Изменение обонятельных порогов обонятельной чувствительности после цинковой аносмии и выдержки в атмосфере запаха камфары.

Таким образом, в ситуации регенерации обонятельного эпителия после воздействия сульфатом цинка может происходить либо значительное увеличение числа „новых” рецепторных клеток, чувствительных к запаху камфары, по сравнению с интактными, либо за счет стимуляции экспрессии тех обонятельных рецепторных структур на молекулярном уровне, которые и обеспечивают увеличение обонятельной чувствительности к использованным нами в качестве стимулов запахам.

Важно также отметить, что пороги обонятельной чувствительности к запаху ИВК, измеренные нами, были на несколько порядков ниже таковых к действию камфары, которые даже в условиях последних экспериментов не достигали уровня чувствительности к ИВК у самцов мышей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты демонстрируют, что обонятельная чувствительность к запаху ИВК у самцов лабораторных мышей значительно выше, чем у самок этого вида. Кроме того, значения пороговой чувствительности к этому запаху на несколько порядков отличались от таковой к запаху камфары.

Поскольку ИВК входит в состав мочи и вагинальных выделений мышей, то наблюдаемые половые различия в величинах обонятельной чувствительности к запаху ИВК могут свидетельствовать в пользу того, что данное вещество может являться фрагментом запахового сигнала, передающего информацию о поле особи у мышей.

„Старение” самцов, связанное с понижением уровня половых гормонов в крови, приводило к увеличению порогов чувствительности у запаха ИВК. Модельные опыты с кастрацией животных продемонстрировали периферический эффект деструктивного воздействия на систему обновления обонятельного эпителия, который удается частично восстановить введением тестостерона. Введение тестостерона интактным самцам повышало их чувствительность к запаху ИВК, а у стареющих животных замедляло проявление этих признаков в обонятельном эпителии.

Наибольшая чувствительность к запаху ИВК наблюдалась у неполовозрелых животных. Уровень андрогенов в этот период у них ниже, чем у половозрелых особей, что может указывать на другие причины, приводящие к увеличению чувствительности к этому запаху. Проведенные нами модельные исследования с предварительной экспозицией в „запаховой атмосфере” ИВК показали, что наблюдается повышение обонятельной чувствительности к этому запаху, как у половозрелых, так и у неполовозрелых животных, причем чувствительность повышается на большую величину при воздействии „запаховой атмосферы” на активно восстанавливающийся эпителий после его разрушения экспериментально вызванной аносмии. Сопоставляя эти результаты и значения более низких порогов к ИВК у неполовозрелых мышей, можно видеть, что в основе как естественного, так и искусственно вызванного явления могут лежать

одни и те же физиологические механизмы, обуславливающие ранний обонятельный импринтинг к этому запаху, связанному с присутствием в гнезде матери.

ВЫВОДЫ

1. Пороги обонятельной чувствительности к запаху ИВК, измеренные с помощью условно-рефлекторных методов исследования, продемонстрировали, что у самцов мышей они достоверно ниже, чем у самок, причем разница в порогах достигает практически 2-х порядков ($p < 0.01$).
2. Величины порогов зависят от уровня андрогенов в крови. Кастрация самцов снижает этот порог ($p < 0,05$), а тестостеронотерапия кастрированных животных приводит к восстановлению на 70% способности к рецепции запаха ИВК. Установлено, что воздействие кастрации затрагивает нейрогенез и обновление рецепторных клеток, уменьшая высоту обонятельного эпителия и число рядов ядер его клеток.
3. Введение тестостерона интактным самцам приводило к достоверному понижению порогов их чувствительности к запаху ИВК. Выявлена корреляция между величинами обонятельных порогов к ИВК и степенью агрессивности самцов.
4. Обонятельная чувствительность к запаху ИВК максимальна у неполовозрелых самцов и самок и не определяется уровнем половых гормонов в этот период.
5. Экспозиция в „атмосфере” запаха ИВК как половозрелых, так и неполовозрелых животных приводит к снижению обонятельных порогов чувствительности к этому запаху, свидетельствуя о том, что повышение чувствительности у неполовозрелых животных основано на механизме „запахового импринтинга”, наблюдаемого в ранний период жизни мышей.
6. Проведение модельных опытов в условиях экспериментально вызванной сульфатом цинка аноsmии, приводящей к временному разрушению, а затем

восстановлению рецепторного аппарата обонятельного эпителия, подтверждают, что в основе повышения чувствительности к постоянно присутствующему запаху может лежать механизм сходный с явлением раннего обонятельного импринтинга.

7. Различия в порогах обонятельной чувствительности к запаху ИВК у самцов и самок мышей, значительно более низкие их величины по сравнению с рецепцией запаха камфары, не входящей в состав мочи и вагинальных выделений этих животных, свидетельствуют о значении запаха ИВК как фрагмента „образа” химического сигнала принадлежности к полу у мышей.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. *Troitskaya V.* Hormonal regulation of male and female mice olfaction. / *V. Troitskaya., S. Melnik, E. Nosova* // XIII Congress ECRO. Siena, 1998. #139.
2. *Мельник С.А.*, Изменение обонятельных порогов у мышей при изменении гормонального статуса. / *С.А. Мельник, Е.Е. Носова* // Структура и регуляция биосистем. Тр. Биол. ф-та Нижегород. гос. ун-та. Вып. 2. Нижний Новгород, 1999. С. 143-148.
3. *Мельник С.А.* Возрастные изменения обонятельных порогов у мышей. / *С.А. Мельник, Е.Е. Носова* // Материалы Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам “Ломоносов”, 2000. Вып. 4. С. 45-46.
4. *Мельник С.А.* Морфологические изменения в органе обоняния после гонадэктомии. / *С.А. Мельник* // Чтения памяти проф. В. В. Станчинского, Вып. 3. Смоленск, 2000. С. 172-174.
5. *Мельник С. А.* Влияние гормонального статуса организма на некоторые морфометрические параметры обонятельной системы. / *С.А. Мельник* // Молодая наука – XXI веку. Тез. докл. междунар. науч. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых. Иваново, 2001. С. 37-38.
6. *Мельник С.А.* Влияние гонадэктомии на некоторые морфометрические характеристики обонятельного эпителия. / *С.А. Мельник* // Структура и

- регуляция биосистем. Тр. Биол. ф-та Нижегород. гос. ун-та. Вып. 3. Нижний Новгород, 2000. С. 156-159.
7. *Мельник С.А.* Изучение возможной корреляции между некоторыми морфометрическими характеристиками самцов лабораторных мышей. / *С.А. Мельник* // Современные проблемы естествознания. Материалы междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых. Владимир, 2001. С. 110-111.
 8. *Носова Е.Е.* Влияние тестостерона на обонятельную чувствительность лабораторных мышей. / *Е.Е. Носова, С.А. Мельник* // Сб. материалов 4-й Пущинской конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пущино, 2001. С. 161.
 9. *Мельник С.А.* Изменение обонятельной чувствительности после экспериментальной цинковой аносмии и выдерживания в атмосфере камфары. / *С.А. Мельник, Е.В. Челогужева, В.Т. Троицкая* // Вестн. Нижегород. Ун-та. Сер. Биол. Вып. 1(2). Нижний Новгород, 2001. С. 147-150.
 10. *Мельник С.А.* К вопросу о влиянии гормонального статуса на обонятельную систему. / *С.А. Мельник, В.Т. Троицкая* // XXVII съезд физиологического общества им. И. П. Павлова. Тез. докл. Казань, 2001. С. 158.
 11. *Мельник С. А.* К вопросу о корреляции между массой гонад и массой обонятельного мозга. / *С.А. Мельник, В.Т. Троицкая* // Архив клинической и экспериментальной медицины. Донецк, 2001. Т. 10, № 2. С. 187.
 12. *Борякова Е.Е.* Возрастная динамика обонятельной чувствительности грызунов к запаху изовалериановой кислоты. / *Е.Е. Борякова, С.А. Мельник* // Вестн. Нижегород. Ун-та. Сер. Биол. Вып. 2(10). Нижний Новгород, 2005. С. 157-162.
 13. *Мельник С.А.* Влияние тестостеронтерапии на обонятельные пороги восприятия изовалериановой кислоты половозрелых самцов лабораторных мышей. / *С.А. Мельник, И.В. Котенкова, В.Т. Троицкая* // Естествознание и гуманизм. Сб. науч. работ. 2005. Т.2, № 3. Сибирский государственный медицинский ун-т, Томск. С. 27.

14. *Мельник С.А.* К вопросу о механизмах поддержания внутривидовой социальной структуры мышевидных грызунов. / *С.А. Мельник, Е.Е. Борякова* // Популяционная экология животных: Материалы Международной конференции «Проблемы популяционной экологии животных», посвященной памяти академика И.А. Шилова, Томск: Томский государственный университет, 2006. С. 155.
15. *Борякова Е.Е.* Модифицирующее влияние экспозиции в запахе различных одорантов на обонятельную чувствительность грызунов. / *Е.Е. Борякова, С.А. Мельник* // Естествознание и гуманизм. Сб. науч. работ. 2006. Т.3, № 2. Сибирский государственный медицинский ун-т, Томск. С. 36-37.
16. *Борякова Е.Е.* Модифицирующее влияние экспозиции в запахе одорантов на обонятельную чувствительность грызунов. / *Е.Е. Борякова, С.А. Мельник* // Вестн. Нижегород. Ун-та. Сер. Биол. Вып. 1(11). Нижний Новгород, 2006. С. 48-50.