

Поведінкові реакції щурів при ентеробіозі

А.В. Савотченко, М.О. Семеніхіна, І.В. Краснянчук,
Р.І. Боговик, А.Е. Гончарова, О.В. Ісаєва

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: savotchenko@biph.kiev.ua

*Найбільш поширеними паразитами лабораторних гризунів є представники родини Oxyuridae. Ми вивчали вплив ентеробіозу на поведінкові реакції щурів лінії Вістар. Моделювання ентеробіозу здійснювали зараженням щурів яйцями гельмінтів *Syphacia muris* та *Aspiculuris tetraptera*. Із використанням поведінкових тестів, визначали рівень тривожності та емоційності, товариськості та загальної соціальної взаємодії, а також формування реакції страху. Було продемонстровано істотне збільшення рівня тривожності у щурів із гельмінтною інвазією: 60 % тварин взагалі уникали відкритих ділянок лабіринтів. Ми не виявили змін інших показників поведінки щурів у проведених дослідженнях. Аналіз лейкоцитарної формули показав тенденцію до збільшення кількості еозинофілів у крові заражених щурів, що може свідчити про реалізацію імунної відповіді внаслідок ентеробіозу. Ключові слова: афективна поведінка; ентеробіоз; поведінкові тести; імунна відповідь.*

ВСТУП

Гострики гризунів – збудники ентеробіозу, включають представників нематод двох родів – *Syphacia* та *Aspiculuris* [1]. Вони зустрічаються у лабораторних гризунів багатьох науково-дослідних установ, головним чином, через недоліки у процесах дегельментизації та діагностики. Наявність гельмінтів у дослідних тварин є небажаним фактором у зв'язку із негативним впливом на результати досліджень: вони призводять до механічних пошкоджень тканин і здатні викликати імунну відповідь, що може проявлятися у змінах сприйнятливості тварин до експерименту [2]. Було показано зміни у рості деяких ліній щурів та мишей внаслідок зараження гостриками *Syphacia muris* [3] та порушення транспорту електролітів у щурів лінії Вістар-Кіото з гіпертензією [4]. Крім того, гострики впливають на поведінку господаря. Так, у заражених гельмінтами *S. obvelata* мишей спостерігалось зменшення дослідницької поведінки [5]. Таким чином, клінічні та експериментальні дані вказують на те, що гострикова інвазія може негативно

впливати на центральну нервову систему, що може призводити до неврологічних порушень [6, 7]. На жаль дослідження впливу ентеробіозу на поведінкові реакції господаря є поодинокими і найчастіше мають ретроспективний, описовий характер. Варто зазначити, що в сучасних літературних джерелах як вітчизняних, так і зарубіжних авторів відсутні дані з комплексного вивчення впливу ентеробіозу на поведінку господаря.

Метою нашої роботи було дослідження впливу гострикової інвазії на різноманітні поведінкові феномени дослідних щурів.

МЕТОДИКА

Всі процедури були виконані відповідно до вимог Директиви Європейського союзу 2010/63/EU про захист тварин, що використовуються у наукових цілях та затверджені комітетом з біомедичної етики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України. Дослідження проводили на 16 щурах-самцях лінії Вістар віком 55-65 днів та масою 234-360 г. Тварин утримували в умовах 12-годинного циклу день/ніч з постійним,

вільним доступом до води та їжі. Для моделювання ентеробіозу використовували яйця гельмінтів, що належать до класу нематод, а саме – *Syphacia muris* (80-90%) та *Aspiculuris tetraptera* (10-20%), отриманих зі спонтанно заражених мишей. Інкубаційний період розвитку інвазії тривав 60 діб. Після чого тварини підлягали проходженню поведінкових тестів. Ступінь інвазії визначали після проведення поведінкових тестів розтином тварин та кількісного підрахунку гельмінтів. За результатами гельмінтологічних досліджень, тварин було поділено на дві групи: контрольну ($n = 6$) та дослідну ($n = 10$).

Для оцінки ступеня загальної локомоторної активності та емоційного стану дослідних щурів, ми використовували тест «відкрите поле» [8]. Кожну тварину, яка його проходила, розташовували у правому дальньому куті квадратної камери (1,0 м x 1,0 м x 0,3 м), умовно поділеної на 25 квадрантів (0,2 м x 0,2 м). Тестування проводили протягом 5 хв, під час якого оцінювали рівень локомоторної активності реєстрацією загальної пройденої відстані, і емоційний стан тварин – порівнянням часу, проведеного у центрі камери, з часом на її периметрі [9].

Наступна серія дослідів була проведена із використанням методики «припіднятий хрестоподібний лабіринт» (ПХЛ) – найвизнанішого тесту для оцінки рівня тривожності у гризунів [10]. Установка для ПХЛ являла собою два перехрещені рукави, причому один з них був закритий стінками. Зона з'єднання чотирьох рукавів (центральна платформа) була 0,1 м x 0,1 м. Установку припідняли над підлогою на 0,5 м. Під час проходження тесту, кожну тварину розташовували на центральній платформі в напрямку відкритого рукава. Протягом 5 хв було оцінено час, проведений у відкритих/закритих рукавах, і кількість входів у відкриті/закриті рукави.

Формування реакції страху вивчали із використанням камери з електрифікованою підлогою та звукогенератором для умовних

сигналів. Після навчання в камері у тварин формуються довгострокові поведінкові зміни. Модель зумовленого страху використовується для вивчення пам'яті та процесів навчання [11]. Тест проходив упродовж 3 діб. В 1-й день дослідну тварину розташовували в експериментальній камері на 5 хв для адаптації, на 2-й день – подавали звуковий сигнал (70 Дб, 10 кс^{-1} , 20 с), після чого тварина отримувала легкий удар електричним струмом по лапах (0,5 мА, 0,5 с). На 3-й день тварині подавали тільки звуковий сигнал. Тривалість завмирання (відсутності рухів протягом щонайменше 1 с) оцінювали впродовж 20 с до та під час звукового сигналу.

Для дослідження соціальної поведінки щурів, використовували тест «перегородка» [12]. Установка мала вигляд трикамерного боксу з плексиглазу довжиною 0,12 м і висотою 0,50 м. У бічні камери, які були відокремлені перегородками з темного плексиглазу, встановлювали однакові за розміром кругові прозорі клітки. В праву камеру перед експериментом переміщали щура (соціальний подразник) такого самого віку і статі, як і дослідна тварина. Клітку в лівій бічній камері залишали порожньою (об'єкт). Під час 1-ої сесії, дослідну тварину поміщали у центральну камеру. Після періоду адаптації (5 хв), перегородки між камерами видаляли і протягом 10 хв фіксували час, проведений поряд з об'єктом або щуром. Під час 2-ої серії тесту «перегородка» вже знайомий для дослідної тварини щур залишався на тому самому місці, а в праву бічну камеру переміщали нового, незнайомого щура відповідного віку і статі. Протягом наступних 10 хв реєстрували час, проведений дослідною твариною із щурами в бічних камерах.

Під час експерименту контролювали масу щурів. У попередніх дослідженнях було показано, що інвазія *S. obvelata* призводить до проліферації Т- і В-лімфоцитів селезінки, що може вплинути на її розміри [13], тому під час розтину тварин зважували селезінку.

Було проведено аналіз лейкоцитарної

формули крові дослідних щурів. Кров забирали з хвостової вени перед розтином тварин. На предметному скельці готували мазок крові, який фарбували методом Романовського. Різні типи лейкоцитів знаходили в чотирьох крайових ділянках фіксованого мазка. Підраховували щонайменше 100 лейкоцитів та визначали відсотковий склад паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів, еозинофілів, базофілів, моноцитів та лімфоцитів.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили за допомогою програм Prism 6 (GraphPad, La Jolla, CA) та Origin 7.5 (OriginLab, Northampton, MA). Аналіз вибірок включав визначення середнього, стандартного відхилення та похибки середнього. Для оцінки статистичної вірогідності міжгрупових розбіжностей використовували непарний тест t Стьюдента. Вірогідними вважали розбіжності при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час виконання тесту «відкрите поле» не спостерігалось істотних відмінностей у загальній дистанції, яку тварини долали протягом 5 хв сеансу в експериментальній камері (вимір локомоторної активності: $9,7 \pm 1,3$ м у контрольній групі та $9,8 \pm 0,7$ м у дослідній; $P = 0,9$). Порівняння часу, проведеного у центральних квадратах, дало змогу простежити певну закономірність у поведінці щурів із ентеробіозом, а саме – 60 % тварин взагалі не відвідували внутрішніх квадратів камери порівняно із контрольною групою тварин, які не залишалися весь час у периметрі камери впродовж тесту. Загальний час, проведений дослідними щурами у центральних квадратах камери, був достовірно меншим порівняно з контролем (вимір тривожності тварин, контрольна група: $15,7 \pm 2,9$ с у центрі; щури з ентеробіозом: $3,3 \pm 1,9$ с; $P < 0,005$; рис.1,а). Отже можна зробити висновок, що зараження дослідних тварин ентеробіозом

не впливає на локомоторну активність, але істотно підвищує рівень тривожності щурів.

Під час виконання тесту ПХЛ 40 % тварин з ентеробіозом уникали відвідування відкритих рукавів лабіринту порівняно з контрольною групою, які всі, окрім одного щура, заходили у відкриті рукави і проводили там у середньому 20 % всього тестування. Загальний час, проведений у відкритих рукавах мав тенденцію до зменшення у групі тварин з гостриковою інвазією ($12,1 \pm 4,9$ %) порівняно з контролем ($21,2 \pm 6,4$ %; $P = 0,27$; рис. 1,б). Також ми спостерігали достовірно зменшення кількості входів до відкритих рукавів щурів із ентеробіозом (див. рис. 1,в). Загальна кількість входів до рукавів лабіринту, за якою можна оцінити рівень локомоторної активності тварин, істотно не

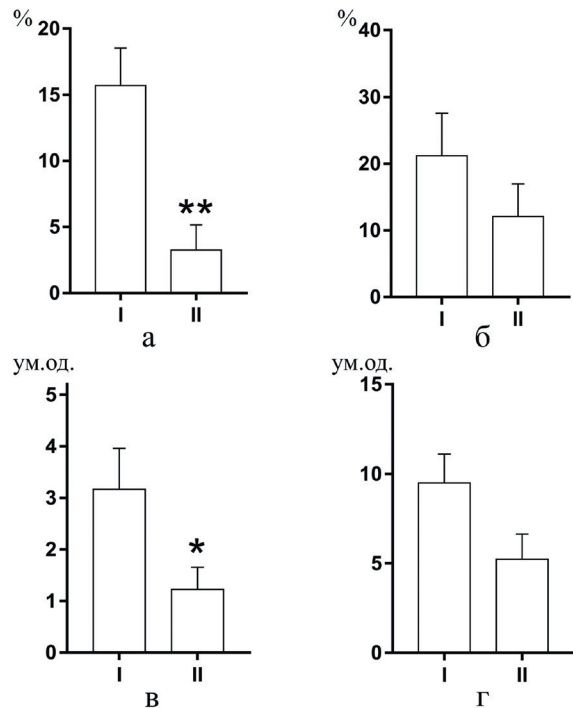


Рис. 1. Зміни у поведінці тварин внаслідок ентеробіозу під час проведення тестів «відкрите поле» та «припіднятий хрестоподібний лабіринт» (ПХЛ): а – час, проведений у внутрішніх квадратах «відкритого поля»; б – загальний час, проведений у відкритих рукавах під час проходження тесту ПХЛ; в – кількість входів у відкриті рукави, г – загальна кількість входів в усі рукави ПХЛ: 1 – контроль, 2 – ентеробіоз. * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$

відрізнялася між групами (див. рис. 1,г).

Впродовж тесту на дослідження формування реакції страху реєстрували час завмирання за наявності або відсутності умовного сигналу. Під час навчання (2-ий день тесту) період завмирання тварин за 20 с до та під час звукового сигналу не відрізнялися між групами (рис. 2,а). На наступний – тестовий день дослідження, цей показник збільшувався в обох групах, що було пов'язано з негативним досвідом, який вони отримали під час навчання. Цей показник не відрізнявся між групами (див. рис. 2,б).

Аналіз соціальної поведінки тварин при використанні тесту «перегородка» показав, що впродовж 1-ї сесії обидві групи тварин проводили більше часу із шуром, ніж з об'єктом і цей час статистично не відрізнявся між групами (рис. 3,а). Слід відмітити, що під час 2-ї сесії тесту тварини обох груп надавали перевагу спілкуванню зі знайомим шуром (див. рис. 3,б).

При вивченні співвідношення білих кров'яних тілець у мазку крові щурів виявлено збільшення кількості еозинофілів внаслідок розвитку ентеробіозу ($P = 0,07$). Число базофілів у групі щурів з ентеробіозом зменшувалось, але різниця також не була статистично значущою ($P = 0,2$; таблиця). Інші показники лейкоцитарної формули залишилися практично незмінними.

Маса щурів істотно не відрізнялася між

групами ($336,8 \pm 3,3$ г у контрольній групі; $330,1 \pm 11,5$ г у дослідній; $P = 0,7$). Відносна

Таблиця 1. Лейкоцитарна формула крові щурів в нормі та при ентеробіозі.

Вміст клітин крові, %	Контроль	Ентеробіоз
Паличкоядерні нейтрофіли	$3,1 \pm 0,9$	$2,9 \pm 0,5$
Сегментоядерні нейтрофіли	$20,7 \pm 1,4$	$21,5 \pm 2,3$
Еозинофіли	$1,2 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,3$
Базофіли	$0,5 \pm 0,1$	$0,28 \pm 0,1$
Моноцити	$4,2 \pm 1,0$	$4,0 \pm 0,6$
Лімфоцити	$70,3 \pm 2,4$	$69,3 \pm 2,6$

маса селезінки також не змінилась під впливом ентеробіозу ($0,24 \pm 0,02\%$ у контрольній; $0,24 \pm 0,01\%$ у дослідній; $P = 0,9$).

Отримані результати свідчать про модуляцію поведінки дослідних щурів внаслідок ентеробіозу. Вони стають більш тривожними та менше цікавляться навколишнім середовищем. Цей факт знаходить підтвердження в обох тестах – «відкрите поле» та «ПХЛ». Слід відзначити, що на фоні зниження дослідницької поведінки щурів із ентеробіозом, їх загальна локомоторна активність залишалася практично незмінною. Тобто тварини із гельмінтною інва-

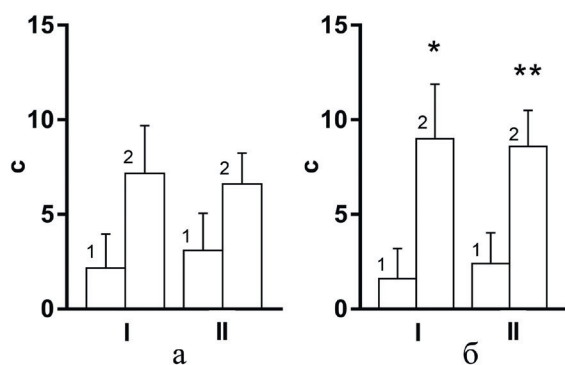


Рис. 2. Вплив ентеробіозу на формування реакції страху (I – контрольна група, II – група з ентеробіозом): а – час завмирань під час навчання; б – час завмирань під час тестування; (1) – другий день тесту, (2) – третій день тесту

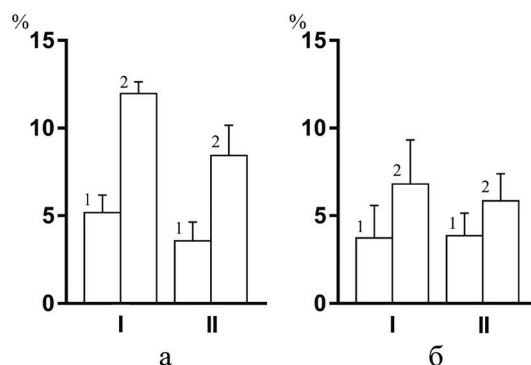


Рис. 3. Соціальна поведінка щурів в умовах ентеробіозу (I – контрольна група, II – група з ентеробіозом): а – рівень товариськості: (1) – час проведений з об'єктом, (2) – час зі шуром; б – реакція на соціальну новизну: (1) – час зі знайомим шуром, (2) – час із «незнайомцем»

зією наполегливо уникали центральних квадрантів відкритого поля та відкритих рукавів хрестоподібного лабіринту, причому більшість щурів жодного разу не заходили у анксиогенні ділянки. Цікавим є спостереження, що окрім рівня тривожності, ні соціальна поведінка, ні емоційнозумовлена пам'ять не змінювалися. Незначна тенденція до підвищення часу завмирання під час проходження тесту з електрифікованою підлогою відмічалася в групі щурів з ентеробіозом, що знову ж таки може свідчити про підвищення тривоги.

Нещодавно було показано, що лімбічна система, до складу якої входять мигдалеподібний комплекс, гіпокамп та енторінальна кора, є ключовою ланкою у формуванні таких поведінкових феноменів, як тривожність, уникнення та дослідницька діяльність, що проявляються під час проходження тестів «відкрите поле» та «ПХЛ» [14]. Як вже було зазначено, ентеробіоз має модифікуючий вплив на імунну систему організму хазяїна, через запуск імунної відповіді за Т - хелпером 2-го типу. Останні виділяють інтерлейкіни, які потрапляють до мозку, де зв'язуються зі специфічними рецепторами та індукують виділення простагландину E2 [15]. Рецептори цитокінів були знайдені в багатьох ділянках мозку, в тому числі й гранулярному шарі зубчастої звивини та пірамідному клітинному шарі гіпокампа [16], що може свідчити про безпосередню роль компонентів імунної відповіді на функціонування центральної нервової системи щурів. Таке припущення можуть підтвердити дослідження, в яких системне введення інтерлейкінів (ІЛ) 1 β або фактора некрозу пухлин (ФНП) α щурам та мишам викликало повний спектр поведінкових ознак «хворобливої» поведінки залежно від концентрації. Після їх ін'єкцій тварини більше часу проводили у кутах клітки в статичній позі, мало або взагалі не цікавилися навколишнім середовищем та соціальним оточенням. У них знижувалася

рухова активність, спостерігалася соціальне відторгнення, зменшувалося споживання їжі та води, знижувався рівень цікавості [17].

Для опосередкованої оцінки включення імунної відповіді внаслідок зараження ентеробіозом, ми аналізували лейкоцитарну формулу крові щурів обох груп. Відомо, що під впливом імуноглобуліну (Ig) E при гельмінтозах активуються два типи клітин, яким належить провідна роль у протигельмінтному захисті – базофіли і еозинофіли. Базофіли локально продукують регуляторні цитокіни (ІЛ-4, ІЛ-10, ІЛ-12, ІЛ-13), прозапальні цитокіни (ІЛ-1, гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (ГМ-КСФ), ФНП- α), індукують Т-незалежним чином продукцію IgE [18]. Еозинофіли є основними ефекторами, які мають антипаразитарну спрямованість за рахунок активації процесів позаклітинного лізису. Еозинофіли містять рецептор для IgE, маркери активації (ранні антигени активації Т-лімфоцитів CD69 і CD66), адгезивні молекули, завдяки яким вони контактують з клітинами ендотелію судин; продукують і виділяють ІЛ-4, ІЛ-5, ГМ-КСФ, ФНП- α , що призводить до утворення еозинофільних інфільтратів у тканинах і органах. Слід відмітити збільшення числа еозинофілів ($P = 0,07$) у щурів з ентеробіозом, як основних маркерів гельмінтної інвазії організму. Не спостерігалася жодних зсувів лейкоцитарної формули та змін у кількості інших видів лейкоцитів внаслідок ентеробіозу. Таким чином, підвищення кількості еозинофілів може свідчити про реалізацію імунної відповіді внаслідок ентеробіозу, яка і може слугувати ймовірною причиною підвищення рівня тривожності заражених щурів.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

**А.В. Савотченко, М.А. Семеніхіна,
І.В. Краснянчук, Р.І. Боговик, А.Э. Гончарова,
Е.В. Ісаєва**

ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ КРЫС ПРИ ЭНТЕРОБИОЗЕ

Наиболее распространенными паразитами лабораторных грызунов являются представители семейства Oxyuridae. Мы изучали влияние энтеробиоза на поведенческие реакции крыс линии Вистар. Моделирование энтеробиоза осуществляли заражением крыс яйцами гельминтов *Syphacia muris* и *Aspicularis tetraptera*. С помощью поведенческих тестов, определяли уровень тревожности и эмоциональности, общительность и общего социального взаимодействия, а также формирование реакции страха. Было продемонстрировано существенное увеличение уровня тревожности крыс в результате гельминтной инвазии: 60% животных полностью избегали открытых участков лабиринтов. Мы не обнаружили изменений других показателей поведения крыс в проведенных исследованиях. Анализ лейкоцитарной формулы показал тенденцию к увеличению количества эозинофилов в крови зараженных крыс, что может свидетельствовать о реализации иммунного ответа вследствие энтеробиоза. Ключевые слова: аффективное поведение; энтеробиоз; поведенческие тесты; иммунный ответ.

**A.V. Savotchenko, M.O. Semenikhina,
I.V. Krasnianchuk, R.I. Bogovyk,
A.E. Honcharova, E.V. Isaeva**

BEHAVIORAL CONSEQUENCES OF ENTEROBIASIS IN RATS

Representatives of the family Oxyuridae are the most common parasites of laboratory rodents. The aim of the present study was to clarify the behavioral consequences of enterobiasis in laboratory rats. Enterobiasis was induced by infecting of adult Wistar rats with eggs of *Syphacia muris* and *Aspicularis tetraptera*. The level of anxiety and emotionality, sociability and general social interaction, as well as the fear associative memory formation were evaluated in rats with and without pinworm invasion. The significant increase in the anxiety level was observed in rats with enterobiasis. We did not find any changes in other behavioral measures in our studies. The analysis of the leukocyte formula showed a tendency to increase the number of eosinophils in the blood of infected rats, which may indicate an implementation of the immune response due to enterobiasis.

Key words: affective behavior; enterobiasis; behavioral tests; immune response.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine; Kyiv.

REFERENCES

1. Meade Th, Watson J. Characterization of rat pinworm (*Syphacia muris*) epidemiology as a means to increase detection and elimination. *J Am Ass Lab Anim Sci.* 2014; 53(6): 661-7.
2. Hsu C. Parasitic diseases: how to monitor them and their effects on research. *Lab Anim.* 1980; 14: 48-53.
3. Wagner M. The effect of infection with the pinworm (*Syphacia muris*) on rat growth. *Lab Anim Sci.* 1988; 38: 476-8.
4. Lubcke R, Hutcheson F, Barbezat G. Impaired intestinal electrolyte transport in rats infested with the common parasite *Syphacia muris*. *Dig Dis Sci.* 1992; 37: 60-4.
5. McNair D, Timmons E. Effects of *Aspicularis tetraptera* and *Syphacia obvelata* on exploratory behavior of an inbred mouse strain. *Lab Anim Sci.* 1977; 27: 38-42.
6. Denhoff E, Laufer M. Pinworm infection and childhood behavior. *Am J Dis Child.* 1949; 77(6): 746-52.
7. Hamed A, Yousif F, Hussein M. Prevalence of nocturnal enuresis and related risk factors in school-age children in Egypt: an epidemiological study. *World J Urol.* 2017; 35(3): 459-65.
8. Semenikhina M, Bogovyk R, Fedoriuk M, Nikolaienko O, Alkury L, Savotchenko A, Krishtal O, Isaeva E. Inhibition of protease-activated receptor 1 ameliorates behavioral deficits and restores hippocampal synaptic plasticity in a rat model of status epilepticus. *Neurosci Lett.* 2018; 692: 64-8.
9. Denenberg V. Open-field behavior in the rat: what does it mean? *Ann N Y Acad Sci.* 1969; 159: 852-9.
10. Pellow S, Chopin P, File S, Briley M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods.* 1985; 14: 149-67.
11. Amikisheva A. Behavioral phenotyping: modern methods and equipment. *Vestn VOG&S.* 2009; 13(3): 529-41. [Russian].
12. Semenikhina M, Bogovyk R, Fedoriuk M, Stasyshyn O, Savotchenko A, Isaeva E. Protease-activated receptor 1 inhibition does not affect the social behavior after status epilepticus in rat. *Fiziol Zh.* 2018; 64(5): 17-23.
13. Beattie G, Braid S, Lipsick J, Lannom R, Kaplan N. Induction of T- and B-lymphocyte responses in antigenitically stimulated athymic mice. *Cancer Res.* 1981; 41: 2322-7.
14. Curia G, Lucchi C, Vinet J, Gualtieri F, Marinelli C, Torsello A, Costantino L, Biagini G. Pathophysiological of mesial temporal lobe epilepsy: is prevention of damage antiepileptogenic? *Curr Med Chem.* 2014; 21(6): 663 - 88.
15. Curtis R, Murray J, Campbell P, Nagamori Y, Molnar A, and Jackson T. Interspecies Variation in the Susceptibility of a Wild-Derived Colony of Mice to Pinworms (*Aspicularis tetraptera*). *J Am Ass Lab Anim Sci.* 2017; 56(1): 42-6.
16. Pamet P, Kelley K, Bluth R, Dantzer R. Expression and regulation of interleukin 1 receptors in the brain. Role in cytokines-induced sickness behavior. *Neuroimmunol.* 2002; 125: 5-14.
17. Dantzer R. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuro-immune response to activation of innate immunity. *Eur J Pharm.* 2004; 500: 399-411.
18. Bourke C, Maizels R, Mutapi F. Acquire dimmune heterogeneity and its sources in human helminth infection. *Parasitology.* 2011; 138: 139-59.

*Матеріал надійшов
до редакції 12.07.2018*