

Roman Hauser¹, Tomasz Gos¹, Marcin Marczak², Jerzy Janicki², Marek Wiergowski¹, Zbigniew Jankowski¹, Bartosz Karaszewski³, Natalia Łuczak⁴, Maciej Krzyżanowski¹, Łucja Wodniak-Ochocińska⁵

Substancje alarmowe jako wykładnik stanu emocjonalnego poprzedzającego zgon

Alarm substances as an exponent of emotional state before death

¹ Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM w Gdańsku
Kierownik: dr hab. Z. Szczerkowska - profesor AM

² Katedra Chemii Analitycznej Politechniki Gdańskiej
Kierownik: prof. dr hab. n. chem. J. Namieśnik

³ Szpital Kliniczny nr 3 w Gdańsku, lekarz stażysta

⁴ Apteka Szpitala im. St. Leszczyńskiego w Katowicach
Kierownik: mgr farm. J. Wróblewska

⁵ Oddział Chorób Wewnętrznych Szpitala Św. Wojciecha Adalberta Gdańsk-Zaspa
Kierownik: dr med. B. Porzezińska

Praca prezentuje wyniki wstępnych badań, których celem jest identyfikacja feromonów alarmowych wydzielanych przez ssaki. Przeprowadzono je na szczurach płci męskiej rasy Wistar. Stosowano wobec nich awersyjne bodźce sensoryczne oraz procedury warunkowania lęku. U badanych zwierząt obserwowano narastanie behawioralnych wykładników zagrożenia. W ich atmosferze zidentyfikowano związki organiczne, których część może odpowiadać substancjom alarmowym. W ocenianych strukturach węchomózgowia stwierdzono wzrost stężenia glutamianu.

This scientific project presents the results of preliminary examinations aimed to identify alarm pheromones secreted by mammals. Wistar male rats were used for the experiment. Animals were treated by aversive sensoric stimuli and fear conditioning procedures. The animals' behaviour was registered. Quantitative and qualitative analysis of air samples taken from their environment was conducted with the use of GC-FID and GC-MSD technics. In the rhinocephalon structures (olfactory bulb, olfactory tract) the concentration of glutamate was measured. During the progress of the experiment increasing behavioral reactions of anxiety were observed in the rats. In their atmosphere organic compounds were identified. Some of them can be considered to be alarm substances. In the examined structures of the rhinocephalon on increased concentration of glutamate in each individual was revealed.

Słowa kluczowe: feromony, substancje alarmowe, emocjonalna odpowiedź, węchomózgowie.

Key words: pheromones, alarm substances, emotional response, rhinocephalon.

WSTĘP

Feromony, związki infochemiczne wydzielane przez zwierzęta („*secret signals among animals*”), odgrywają ważną rolę w ich społecznym bytowaniu. Służą do wywoływania pożądanych reakcji u osobników tego samego gatunku w celu zdobycia pożywienia, obrony, reprodukcji, mają istotne znaczenie w relacjach potomstwo - matka (4, 6, 21). Ich występowanie wykazano dotąd u ponad 1500 gatunków zwierząt, głównie owadów. Feromonami posługuje się prawdopodobnie większość organizmów. Ich izolacja i identyfikacja jest jednak niezwykle trudna z uwagi na bardzo niskie stężenia u źródła i progowe wartości stężeń aktywnych. Do najbardziej znanych z 30 wyodrębnionych grup należą feromony płciowe, ścieżkowe, znaczące terytorium, agregacyjne, rozpraszające (7, 14).

Substancje infochemiczne wydzielane w sytuacji zagrożenia kolonii czy gniazda wywołują szereg reakcji lękowych. U gryzoni zaobserwowano wzmożenie czujności i pojawienie się behawioralnych wykładników strachu w odpowiedzi na substancje emitowane przez ich predatory i stresowane osobniki tego samego gatunku (5, 25, 29). W reakcji na te substancje następowała u nich także zmiana aktywności układu immunologicznego manifestująca się zmniejszeniem produkcji interleukiny 2, redukcją cytotoxycznosci komórek NK oraz zwiększeniem produkcji IgM i IgG (3). Substancje te określa się mianem feromonów alarmowych (3, 27) Ich detektorem u ssaków są chemoreceptory narządu przylemieszowego (*vomero-nasal organ* - VNO), które za pośrednictwem komórek mitralnych dodatkowej opuszki węchowej (*accessory olfactory bulb* - AOB) wysyłają pobudzenia do pierwszorzędowej kory węchowej i do układu odpowiedzi lękowej OUN: ciało migdałowate, jądro przykomorowe (PVN-CRH system) i miejsce sinawe mostu (LC-NE system) (13, 17, 22). Wykazano również, iż bodźce węchowe powodują aktywację mózdzku (26). Donosi się, że rolę feromonów alarmowych może pełnić szereg związków organicznych: acyklicznych, karbocyklicznych, heterocyklicznych. Dotychczas wyosobniono substancje alarmowe syntetyzowane przez owady, roztocza, ryby (16, 19, 24, 28). Feromonów alarmowych emitowanych przez ssaki nie zidentyfikowano. Nieznana jest także droga ich wydzielania. Opracowania dotyczące emisji i odbioru substancji alarmowych przez człowieka nie są autorom znane.

CEL PRACY

Celem badań jest wytypowanie związków organicznych mogących pełnić

u ssaków rolę feromonów alarmowych. Są one etapem realizowanego od kilku lat projektu badawczego służącego odpowiedzi na pytanie, czy na podstawie badań pośmiertnych możliwa jest ocena krótkotrwałych silnych emocji poprzedzających bezpośrednio zgon (9, 10, 11, 12).

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 18 szczurach płci męskiej rasy Wistar. Składały się on z trzech części.

Część pierwsza. W 2 odseparowanych klatkach umieszczono po 4 zwierzęta. Klatkę z osobnikami grupy I przenoszono przez 4 kolejne dni na 5 min. do zamkniętego kompartmentu o objętości 20 dm³, w którym poddawano je awersyjnym bodźcom sensorycznym: mechanicznym, akustycznym, optycznym (8). Piątego dnia zwierzęta pozostawiono w kompartmencie w warunkach całkowitego spokoju. Każdego dnia, po wietrzeniu kompartmentu, umieszczano w nim na 5 min. szczury grupy II, wobec których bodźcowania nie stosowano. Przez cały okres trwania eksperymentu zachowanie osobników przebywających w kompartmencie było rejestrowane przez niezależnych obserwatorów. Piątego dnia, bezpośrednio przed wyjęciem z kompartmentu obu grup zwierząt, związki organiczne zawarte w próbkach powietrza z kompartmentu o objętości 1 dm³ (łącznie 2 próbki) izolowano na złoże sorbentu (Tenax -TA) w rurce sorpcyjnej. Związki te uwalniano następnie w procesie desorpcji termicznej i kierowano do układu GC-FID .

Część druga. W trakcie pierwszych czterech dni badań, bezpośrednio po wyjęciu z kompartmentu szczurów grupy I i II, przed jego wietrzeniem, wkładano do niego na okres 5 min po 1 nowym osobniku (łącznie 8 nowych osobników, w tym 4 kontrolne). Kompartment jak zwykle zamykano. Po terminacji zwierząt z użyciem CO₂ natychmiast je dekapitowano, wyjmowano ich mózgi i sekcjonowano na lodzie. Oddzielone opuszki węchowe wraz z pasmami węchowymi umieszczano w ciekłym azocie. Czas, który upływał od zgonu zwierzęcia do umieszczenia tkanki w niskiej temperaturze nie przekraczał 5 min. W pobranej tkance oznaczano stężenie glutaminianu przy pomocy dehydrogenazy glutaminianowej i NAD wg Bernta i Bergmeyera oraz stężenie białka metodą Petersona (8).

Część trzecia. W 2 odseparowanych klatkach umieszczono po 1 osobniku. Pierwszego dnia (I etap) klatki kolejno umieszczano na 5 min. w zamkniętym kompartmencie o objętości 5 dm³. Zwierząt nie bodźcowano. Przez 4 kolejne dni na zwierzęta umieszczane w kompartmencie działano przez 5 min. awersyjnymi bodźcami sensorycznymi. Piątego dnia przez pierwsze 5 min. zwierzęta pozostawiano w całkowitym spokoju (II etap) po czym, po wietrzeniu kompartmentu, stosowano wobec nich przez kolejne 5 min. sensoryczne bodźce (III etap). Tok postępowania analitycznego po zakończeniu każdego etapu był podobny jak opisany wyżej. Jedyna różnica polegała na zastosowaniu układu

GC-MSD na etapie identyfikacji analitów.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Część pierwsza. Osobniki grupy I bezpośrednio po włożeniu do kompartmentu, wykazywały od drugiego dnia narastanie behawioralnych wykładników lęku, manifestujących się przez zamieranie (reakcja typu *freezing*) i mycie się (reakcja typu *grooming*). Piątego dnia były one wyrażone w trakcie całego czasu pobytu w kompartmentcie; dominowała w nich reakcja *freezing*. Zachowanie osobników grupy II każdego dnia w trakcie przebywania w kompartmentcie było typowe.

Ocena chromatogramów otrzymanych z analizy ilościowej (GC-FID) gazowej zawartości kompartmentu wykazała szereg związków wspólnych dla atmosfery obu grup szczurów. Mogła też nasuwać przypuszczenie obecności związków indywidualnych dla atmosfery zwierząt grupy I oraz związków indywidualnych dla atmosfery zwierząt grupy II.

Część druga. Osobniki eksponowane w atmosferze szczurów bodźcowanych po zauważalnym wzdrygnięciu (reakcja typu *startle*) wykazywały krótkotrwałą reakcję *freezing*, następnie kilkunastosekundowe pobudzenie ruchowe (reakcja typu *flight or fight* - uciekaj albo walcz), po czym zachowywały się spokojnie. W pobranych strukturach węchomózgowia tych szczurów stwierdzono następujące stężenia glutaminy: 143, 141, 137, 135 (średnia: 139) nmol/mg białka. Zachowanie osobników kontrolnych, eksponowanych w atmosferze szczurów nie poddawanych podżcowaniu było typowe. W strukturach węchomózgowia tych szczurów wykazano następujące stężenia glutaminy: 126, 124, 110, 106 (średnia: 116,5) nmol/mg białka.

Część trzecia. U obu zwierząt, jak w przypadku osobników grupy I z części pierwszej, obserwowano przez kolejne dni nasilanie się behawioralnych oznak lęku przed bodźcowaniem. Ocena 6 chromatogramów otrzymanych z analizy jakościowej (GC-MSD) gazowej zawartości kompartmentu wykazała: powtarzalne pojawianie się w II i III etapie węglowodorów, alkoholi, aldehydów, ketonów, kwasów, estrów, związków heterocyklicznych - w I etapie nieobecnych; pojawienie się u obu osobników podobnych różnic między stężeniami tożsamyh związków zidentyfikowanych w etapie II i III; powtarzalną obecność związków, których stężenia były wyższe w etapie II niż III i związków o stężeniach wyższych w etapie III niż II.

DYSKUSJA

Autorzy opracowań dotyczących zagadnienia feromonów podkreślają duże trudności towarzyszące ich wykrywaniu. Uważa się, że działają one w skompli-

kowanych mieszaninach, których aktywność uwarunkowana jest składem i stereoizomerią pojedynczych dominujących składników (20, 23). Skład tych mieszanin może zależeć nawet od takich czynników jak pora roku, dnia, czy wiek osobnika.

Znaczenie VNO w odbiorze feromonów alarmowych oraz rola jego neuronów w aktywacji układu neuroendokrynowego i dalej wywoływaniu reakcji lękowych zostały dobrze udokumentowane (15, 27). Ostatnio wykazano, że kontakt szczurów z substancjami alarmowymi emitowanymi przez inne osobniki powoduje w komórkach mitralnych AOB wzrost ekspresji białka szybkiej odpowiedzi Fos (27). Zwiększenie aktywności tego białka stwierdzono także w regionach mózgu szczura odpowiedzialnych za wyzwalanie lęku i reakcje obronne: ciało migdałowe, jądro brzusznośrodkowe i grzbietowośrodkowe podwzgórza, jądro grzbietowe przedsuteczkowe i substancja szara okołokomorowa, po jego wystawieniu na działanie zapachu predatora (5). Szczury wprowadzone do środowiska, w którym uprzednio stresowano inne osobniki, wykazywały wzrost temperatury ciała oraz obniżenie proggu drgawkowego (2, 27).

W badanych przez autorów strukturach węchomózgowia szczurów zamkniętych w atmosferze, w której uprzednio poddawano bodźcowaniu osobniki inne, stwierdzono wzrost stężenia glutaminy, głównego neuroprzekaznika pobudzającego OUN. Zachowanie tych szczurów posiadało cechy reakcji lękowej.

Behawioralne wykładniki lęku obserwowano także u szczurów, wobec których stosowano procedury jego warunkowania, czyli u zwierząt grupy I z części pierwszej i zwierząt użytych w części trzeciej. Narastały one stopniowo do ostatniego dnia badań. Podobne spostrzeżenia mieli inni autorzy posługujący się takim samym modelem doświadczalnym (27).

Podczas analizy jakościowej atmosfery szczurów poddawanych warunkowaniu lęku (część trzecia, etap II) zidentyfikowano związki, których stężenia były wyższe od stężeń tożsamyh związków zidentyfikowanych w atmosferze tych szczurów po ich awersyjnym bodźcowaniu (część trzecia, etap III). Mogło to mieć związek z pobudzeniem układu sympatycznego, chociaż towarzyszy temu centralizacja krążenia i zmniejszenie wydzielania gruczołów egzokrynowych. Natomiast w atmosferze szczurów bodźcowanych zidentyfikowano związki, których stężenia przekraczały wartości stężeń tych samych związków zidentyfikowanych w atmosferze szczurów poddawanych warunkowaniu lęku. Przyjmując, że część z rozpoznanych organicznych substancji może odpowiadać substancjom alarmowym możnaby więc hipotetycznie założyć istnienie substancji alarmowych emitowanych w sytuacji zagrożenia i innych, emitowanych w sytuacji ucieczki, walki, agresji.

Zważywszy, że synteza feromonów alarmowych powinna zachodzić szybko i że powinny one działać krótko należałoby ich szukać wśród posiadających prostą budowę i niską masę cząsteczkową związków lotnych. Wobec tego przypuszczenie, że rolę substancji alarmowych emitowanych przez ssaki pełnią kwasy tłuszczowe, sterydy i katecholaminy staje się wątpliwe (1, 18). Być może należałoby więc zwrócić uwagę na te spośród zidentyfikowanych związków, które są krótkołańcuchowymi węglowodorami, aldehydami, estrami.

Przedstawione badania mają charakter wstępny i orientacyjny. Zostały wykonane na niewielkiej grupie zwierząt. Uzyskane wyniki pozwalają jednak na nadanie im właściwego kierunku oraz skłaniają do ich prowadzenia także na modelu ludzkim.

Gdyby, wybiegając w przyszłość, na podstawie pośmiertnej analizy substancji alarmowych była możliwa interpretacja przedśmiertnego stanu emocjonalnego zmarłej osoby, dałoby to szansę praktycznej realizacji oceny silnych emocji poprzedzających zgon w przypadkach gwałtownej, którym może towarzyszyć sytuacja kryminalna. Posiadanie takich możliwości mogłoby odegrać istotną rolę w określaniu okoliczności zgonu w często trudnych diagnostycznie sądowno - lekarskich przypadkach. Stanowiłoby także cenną wskazówkę ukierunkowującą czynności śledcze prowadzone przez organa ścigania.

PIŚMIENNICTWO

I. Abel E.L.: Alarm substance emitted by rats in the forced-swim test is a low volatile pheromone. *Physiol. Behav.* 1991, 50, 723-727. - 2. Abel E.L., Bilitzke P.J., Cotton D.B.: Alarm substance induces convulsions in imipramine treated rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1992, 41/3, 599-601. - 3. Cocks R., Moynihan J.A., Cohen N., Grota L.J., Ader R.: Exposure to conspecific alarm chemosignals alters immune responses in BALB/c mice. *Brain. Behav. Immun.* 1993, 7 36-46 - 4. Devor M., Schneider G.E.: Attraction to home-cage odour in hamster pups specificity and changes with age. *Behav. Biol.* 1974, 10, 211-221. - 5. Dielenberg R.A., McGregor I.S.: Defense behavior in rats towards predator odours a review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2001, 25, 597-609. - 6. Drickamer L.C. Delay of sexual maturation in female house mice by exposure to grouped females or urine from grouped females. *J. Reprod. Fertil.* 1977, 51, 77-81. - 7. Gamboa G.J., Grudzień T.A., Espelie K.E., Bura E.A.: Kin recognition pheromones in social wasps: combining chemical and behavioural evidence. *Anim. Behav.* 1996, 51, 625-629. - 8. Gos T., Hauser R., Krzyżanowski M.: Stężenie glutaminianu w tkance mózgowej jako odzwierciedlenie krótkiej awersyjnej stymulacji bezpośrednio przed śmiercią. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 1999, 49, 171-178. - 9. Gos T., Hauser R., Krzyżanowski M.: The post-mortem concentration of glutamate in the structures of rat brain as an exponent of short aversive sensory stimulation preceding death. *Forensic Sci Int.* 2002, 123/2-3, 130-134. - 10. Gos T., Hauser R., Krzyżanowski M.: Regional distribution of glutamate in the central nervous system of rat terminated by carbon dioxide euthanasia. *Lab. Anim.* 2002, 36, 127-133.

II. Hauser R., Gos T., Krzyżanowski M., Goyke E.: The concentration of glutamate in cerebral tissue as a factor for the assessment of the emotional state before death. A preliminary report. *Int. J. Legal. Med.* 1999, 112/3, 184-187. - 12. Hauser R., Gos T., Hartwich J., Dębiriska-Kieć A.: The activity of constitutive nitric oxide synthase in prefrontal cortex of rats as an exponent of emotional state before death. A preliminary report. *Neural Plasticity*, 2000, 7/3, 205-211. - 13. Hines P.J.: Unconscious odours. *Science.* 1997, 278, 7. - 14. Jackson B.D.,

Morgan E.D.: Insect chemical communication: pheromones and exocrine glands of ants. *Chemoecology*, 1993, 4, 125-144. - 15. Kevetter G.A., Winans S.S.: Connections of the corticomedial amygdala in the golden hamster: I. Efferents of the "vomeronasal amygdala". *J. Comp. Neurol.* 1981, 197, 81-98. - 16. Kuwahara Y., Akimoto K., Leal W.S., Nakao H., Suzuki T.: Isopiperitenone, a new alarm pheromone of the acarid mite, *Tyrophagus similis* (Acarina, Acaridae), *Agric. Biol. Chem.* 1987, 51, 3441-3442. - 17. LeDoux J.E.: The emotional brain. The mysterious underpinnings of emotional life. Simon & Shuster, New York, 1998. - 18. Leinders-Zufall T., Lane A.P., Puchę A.C., Mao W., Novotny M.V., Shipley M.T., Zuffal F.: Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons, *Nature*. 2000, 405, 792-796. - 19. Mathias A., Smith R.J.F.: Chemical labelling of northern pike (*Esox lucius*) by the alarm pheromone of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *J. Chem. Ecol.* 1993, 19, 1967-1979. - 20. Mori K.: Molecular Asymmetry and Pheromone Science. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1996, 60, 1925-1932.

21. Novotny M., Harvey S., Jemioło B., Alberts J.: Synthetic pheromones that promote inter-male aggression in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1985, 82, 2059-2061. - 22. Rangel S., Leon M.: Early odour preference training increase olfactory bulb norepinephrine. *Brain. Res.* 1995, 85/2, 187-191. - 23. Rasmussen L.E.L. Lee T.D., Zhang A., Roelofs W.L., Daves G.D. Jr: Purification, Identification. Concentration and Bioactivity of (Z)-7-Dodecen-1-yl Acetate: Sex Pheromone of the Female Asian Elephant, *Elphas maximus*. *Chem. Senses.* 1997, 22, 417-437. - 24. Sandoz J.C., Pham-Delegue M.H., Renou M., Wadhams L.J.: Asymmetrical generalisation between pheromonal and floral odours in appetitive olfactory of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *J. Comp. Physiol.* 2001, 187/7, 559-568. - 25. Stevens D.A., Saplikoski N.J.: Rats reactions to conspecific muscle and blood: evidence for an alarm substance. *Behav. Biol.* 1973, 8/1, 75-82. - 26. Sobel N., Prabhakaran V., Hartley C.A., Desmond J.E., Zhao Z., Glover G.H., Gabrieli J.D., Sullivan E.V.: Odorant-induced and sniff-induced activation in the cerebellum of the human. *J. Neurosci.* 1998, 18, 8990-9001. - 27. Takefumi K., Shu T., Yukari T., Yuji M.: Alarm pheromone enhances stress-induced hyperthermia in rats. *Physiol Behav.* 2001, 72, 45-50. - 28. Vandenberg J.D.: Alarm pheromone knocks off russian wheat aphids. *Agr. Res.* 2000, 48/7, 22.

Adres pierwszego autora:
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
ul. Curie Skłodowskiej 3a
80-210 Gdańsk