

УДК 57.017.645; 599.323.4

## РАННИЙ ПОСТНАТАЛЬНЫЙ ОПЫТ МОДИФИЦИРУЕТ АКТИВАЦИЮ ГИПОФИЗАРНО-СЕМЕННИКОВОГО КОМПЛЕКСА У САМЦОВ ДОМОВЫХ МЫШЕЙ (*MUS MUSCULUS*) ПРИ ЭКСПОЗИЦИИ К ЗАПАХУ РЕЦЕПТИВНЫХ КОН- И ГЕТЕРОСПЕЦИФИЧНЫХ САМОК

© 2023 г. Е. В. Котенкова<sup>1,\*</sup>, Е. В. Кузнецова<sup>1</sup>, А. Н. Мальцев<sup>1</sup>, А. В. Амбарян<sup>1</sup>

Представлено академиком РАН В.В. Рожновым

Поступило 20.03.2023 г.

После доработки 10.04.2023 г.

Принято к публикации 11.04.2023 г.

Впервые получены данные, доказывающие модификацию активации гипофизарно-семенникового комплекса самцов домовых мышей под влиянием раннего постнатального опыта и материнской среды при экспозиции к запаху рецептивных самок своего и близкородственного вида. Мы подтвердили сопряженность формирования поведенческих и физиологических механизмов прекопуляционной изоляции в раннем онтогенезе. Уровень свободного тестостерона (УСТ) в сыворотке крови самцов близкородственных видов *M. spicilegus* и *M. t. wagneri* различается, он существенно ниже у курганчиковых мышей. УСТ самцов, воспитанных конспецифичной самкой, был достоверно ниже при экспозиции им запаха гетероспецифичной, чем при предъявлении запаха самки своего вида. Воспитание самцов *M. t. wagneri* самками близкородственного вида обуславливало уменьшение тестостеронового ответа самцов на предъявление хемосигналов от самки (как гетеро-, так и конспецифичной) и приводило к отсутствию различий в УСТ при экспозиции запаха самки своего или близкородственного вида. Полученные данные свидетельствуют о существенном влиянии условий воспитания на формирование гормональных механизмов репродуктивной изоляции.

**Ключевые слова:** ранний опыт, материнская среда, уровень тестостерона, обонятельные сигналы, механизмы изоляции

DOI: 10.31857/S2686738923700294, EDN: IRVGCN

У млекопитающих, в том числе и домовых мышей, реакция на видоспецифический запах формируется в раннем постнатальном онтогенезе в результате импринтинга, или иных форм обучения, что в дальнейшем сказывается на проявлении разных форм поведения, определяющих выбор полового партнера своего вида, т.е. на формировании механизмов прекопуляционной изоляции [1]. Одним из механизмов репродуктивной изоляции, препятствующих спариванию с гетероспецифичными особями, у млекопитающих, в том числе и домовых мышей, служит реакция на обонятельные сигналы, что может быть обусловлено различиями в составе сигнальных соединений

(феромонов), содержащихся в моче близкородственных видов [2, 3] и вызывающих определенные физиологические реакции у конспецификов [4]. При экспозиции конспецифичной самки запускается ряд поведенческих и физиологических реакций, которые стимулируют половое поведение и обычно приводят к спариванию [4]. Активацию гипофизарно-семенникового комплекса у самцов вызывает непосредственный контакт с рецептивными конспецифичными самками или предъявление им запаха таких самок [5–8]. Экспозиция рецептивной самки своего вида, в отличие от самки близкородственного, вызывала подъем уровня тестостерона в плазме крови у самцов двух симпатрических видов *Mus musculus* (L. 1758) и *M. spicilegus* (Petenyi 1882) [9]. Одним из основных подходов к изучению влияния раннего опыта на последующее поведение и реакцию на кон- и гетероспецифичные стимулы служит воспитание потомства представителями другого вида

<sup>1</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: evkotenkova@yandex.ru

[1, 10]. Это может приводить к предпочтению запаха особей вида-воспитателя вместо запаха своего вида. Выращивание детенышей приемными родителями близкородственного вида модифицировало ассортативность выбора кон- и гетероспецифических запахов у домашних и курганчиковых мышей. *M. spicilegus*, выкормленные самками *M. musculus musculus*, предпочитали запах самок вида-воспитателя, *M. m. wagneri*, воспитанные *M. spicilegus*, и *M. spicilegus*, выращенные *M. m. wagneri*, не проявляли предпочтения запаха самок своего или выкормившего их вида [11]. Высказана гипотеза об автономности поведенческих и физиологических реакций в ответ на запахи, согласно которой под влиянием раннего обонятельного опыта могут модифицироваться лишь поведенческие ответы, физиологические же не подвергаются изменениям [12]. Нам не известны работы, связанные с особенностями активации гипофизарно-семенникового комплекса самцов домашних мышей и других видов грызунов, выращенных представителями близкородственного вида, в ответ на экспозицию запаха рецептивных конспецифичных самок и самок вида-воспитателя, что могло бы подтвердить или опровергнуть высказанную гипотезу.

Цель работы состояла в выявлении влияния раннего опыта и материнской среды на формирование физиологических механизмов прекопуляционной изоляции у домашних мышей, их автономности или сопряженности с поведенческими механизмами репродуктивной изоляции. Задача заключалась в сравнении гормонального ответа (уровня свободного тестостерона, далее УСТ, в сыворотке крови) у самцов *M. m. wagneri*, воспитанных в семьях близкородственного вида *M. spicilegus*, в ответ на запах рецептивных конспецифичных самок и самок вида-воспитателя. Нами впервые получены данные, доказывающие модификацию активации гипофизарно-семенникового комплекса самцов под влиянием раннего постнатального опыта и материнской среды при экспозиции к запаху рецептивных самок своего и близкородственного вида. Мы подтвердили сопряженность формирования поведенческих и физиологических механизмов прекопуляционной изоляции в раннем онтогенезе.

Проведены эксперименты с самцами домашних мышей, воспитанных представителями близкородственного вида. В возрасте 2–3 сут самцов *M. m. wagneri* перекладывали парам близкородственного вида *M. spicilegus*. Детенышей-самок оставляли в своих семьях. В возрасте 40 сут самцов отсаживали от взрослых особей в однополые группы, каждый помет – в отдельную клетку. В 60 сут рассаживали индивидуально в стеклянные камеры с металлическими крышками, где проводили опыты. Всего использовано: самцов *M. m. wagneri* – 29 воспитанных конспецифичны-

ми самками и 13 – самкой *M. spicilegus*; самцов *M. spicilegus* – 23 воспитанных конспецифичной самкой.

Все экспозиции проводили в одно и то же время суток (с 11.00 до 13.00 ч). Каждому самцу мочу экспонировали дважды (в жилой клетке по 20 мкл, в течение 30 мин с последующим забором крови не более 0.15 мл из ретро-орбитального синуса. [13]): один раз от самок своего, а второй раз – вида-воспитателя с промежутком 8 или 16 дней. В контрольной серии предъявляли физраствор (табл. 1). Кровь собирали в чистые микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф, центрифугировали 10 мин при 3000 г для отделения сыворотки, которую переносили в чистые пробирки и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  (не более 1 мес с момента взятия крови) до проведения измерения концентрации свободного тестостерона методом гетерогенного иммуноферментного анализа (в пг/мл) с помощью набора реактивов компании “DRG Diagnostics” (Германия, каталожный номер EIA2924) согласно рекомендациям фирмы-изготовителя. Оптическую плотность растворов в лунках планшета измеряли при длине волны 450 нм с помощью планшетного спектрофотометра iMark (Bio-rad, США).

Для анализа данных использовали статистическую программу Xlstat 2019.2.2. Проведены межгрупповые сравнения пропорций УСТ от максимально возможной (детектируемой) концентрации в 100 единиц по формуле  $N \times 100$ , где 100 – максимальная детектируемая концентрация свободного тестостерона, а N – число элементов в выборке. Пропорции сравнивали с использованием критерия  $\chi^2$ . Попарные сравнения пропорций проводили с использованием процедуры Мараскуило. Уровень значимости при попарных сравнениях  $\alpha = 0.05$ .

Результаты попарного сравнения пропорций УСТ от максимально возможного уровня для каждой из групп свидетельствуют о том (тест  $\chi^2$ : статистика теста ( $\chi^2$ ) – 1271.612,  $P < 0.0001$ , табл. 2), что у самцов *M. spicilegus*, воспитанных конспецификами, при предъявлении физраствора пропорция УСТ была наименьшей среди всех остальных групп, т.е. фоновый УСТ самцов этого вида гораздо ниже такового, чем у самцов *M. m. wagneri*. УСТ у самцов *M. spicilegus* достоверно возрастал при экспозиции как к моче самок-конспецификов, так и *M. m. wagneri*. Относительно низкий УСТ у самцов *M. spicilegus* вне социального контекста, связанного с присутствием особей противоположного пола, по-видимому, можно объяснить более высоким уровнем кортикостерона у особей этого экзотропного вида. Это может быть связано как с отбором и эволюционными изменениями, которые определяют особенностями среды обитания в открытых степных биотопах и агроценозах, так и

с особенностями социальной структуры группировок и системой размножения, которую можно считать факультативной моногамией, что отличает ее от социальной структуры и преимущественно полигамной системы размножения у *M. musculus* [14]. Курганчиковые мыши характеризуются высокой степенью территориальности и контакты между незнакомыми особями (как самцами, так и самками) могут быть крайне агрессивными. Это также может способствовать закреплению в ходе эволюционных преобразований относительно высокого уровня кортикостерона у самцов этого вида. При этом УСТ у самцов *M. t. wagneri*, воспитанных конспецифичными самками, при экспозиции к физраствору высок и сопоставим с таковым при экспозиции к запаху самки своего вида. Гетероспецифичность самки-воспитателя или типа запахового сигнала и их сочетание определяли более низкий УСТ у разных групп самцов *M. t. wagneri*. При этом различие в УСТ между самцами этих групп не было достоверным. Важно отметить, что УСТ самцов, воспитанных конспецифичной самкой, был достоверно ниже при экспозиции им запаха гетероспецифичной, чем при предъявлении запаха самки своего вида. Однако он достоверно не отличался от УСТ самцов *M. t. wagneri*, воспитанных самкой *M. spicilegus*, причем как при предъявлении этим самцам запаха гетероспецифичной самки, так и при предъявлении им запаха конспецифичной самки (хотя в этом случае снижение УСТ выражено в меньшей степени). Гетероспецифичность как самки-воспитателя, так и типа запахового сигнала у самцов *M. t. wagneri*, воспитанных самкой *M. spicilegus*, снижала УСТ в наибольшей степени и более всего приближала его к таковому у самцов *M. spicilegus*, экспонировавшихся к конспецифичному сигналу. Таким образом, воспитание самцов *M. t. wagneri* самками другого близкородственного вида обуславливало как уменьшение тестостеронового ответа самцов на предъявление хемосигналов от самки (причем как гетеро-, так и конспецифичной), так и приводило к отсутствию различий в УСТ при предъявлении запаха самки своего или близкородственного вида. Можно предположить, что это связано с модифицированным восприятием видовой идентичности особей противоположного пола у самцов *M. t. wagneri*, воспитанных самками *M. spicilegus*. Неполное соответствие поведенческого паттерна воспитавшей этих самцов самки видоспецифическому, вероятно, способствовало формированию у самцов *M. t. wagneri* более неопределенного и/или “обобщенного” обонятельного образа видовой специфичности. Это могло способствовать как снижению интенсивности (относительно низкий УСТ), так и уменьшению видоспецифической направленности (слабо различающиеся реакции на запах кон- и гетероспецифичной самки у самцов, воспитанных самками близко-

Таблица 1. Число экспозиций запахов и значения УСТ в экспериментальных группах

Число предъявлений запаха, значения УСТ (пг/мл)	Экспериментальные группы*						
	<i>spicilegus/spicilegus</i> — физраствор	<i>spicilegus/spicilegus</i> — моча <i>spicilegus</i>	<i>spicilegus/spicilegus</i> — моча <i>wagneri</i>	<i>wagneri/wagneri</i> — физраствор	<i>wagneri/wagneri</i> — моча <i>wagneri</i>	<i>wagneri/wagneri</i> — моча <i>spicilegus</i>	<i>wagneri/spicilegus</i> — моча <i>spicilegus</i>
Число предъявлений	8	6	6	8	13	9	7
Минимальные/максимальные/медиана значений УСТ	0.020/0.160/0.095	0.120/23.590/2.150	0.130/100.000/2.740	0.040/100.000/61.795	0.340/100.000/85.200	0.230/69.940/11.320	0.110/95.070/0.760

\* Условные обозначения: *M. t. wagneri*, воспитанные своим видом — *wagneri/wagneri*; *M. t. wagneri*, воспитанные *M. spicilegus* — *wagneri/spicilegus*; *M. spicilegus*, воспитанные своим видом — *spicilegus/spicilegus*.

В названиях групп последовательно через дефис приведены самцы-реципиенты запаха, тип запахового сигнала.

Таблица 2. Парные сравнения групп самцов *M. spicilegus* и *M. wagneri* по пропорции УСТ

Группы самцов, с которыми производится сравнение (вид самца-реципиента/вид самки-воспитателя-запаховый сигнал-значение пропорции УСТ)	Группы самцов, определяемые комбинацией видоспецифичности самки-воспитателя и типом запахового сигнала		Пропорции	Абсолютные значения разности пропорций (статистика теста)	Критические значения статистики теста (t)	Достоверность различий
	Вид самца/вид самки воспитателя	Запах (моча самки в эструсе)				
<i>spicilegus/spicilegus</i> -физраствор-0.0013	<i>spicilegus/spicilegus</i>	<i>wagneri</i>	0.0600	0.059	0.037	да
	<i>spicilegus/spicilegus</i>	<i>spicilegus</i>	0.1883	0.187	0.060	да
<i>spicilegus/spicilegus</i> -моча <i>spicilegus</i> -0.1883	<i>wagneri/wagneri</i>	<i>wagneri</i>	0.5685	0.380	0.079	да
	<i>wagneri/wagneri</i>	<i>spicilegus</i>	0.2222	0.034	0.079	нет
	<i>wagneri/spicilegus</i>	<i>wagneri</i>	0.2763	0.088	0.084	да
	<i>wagneri/spicilegus</i>	<i>spicilegus</i>	0.2100	0.022	0.083	нет
<i>wagneri/wagneri</i> -физраствор-0.5338	<i>wagneri/wagneri</i>	<i>wagneri</i>	0.5685	0.035	0,084	нет
<i>wagneri/wagneri</i> -моча <i>wagneri</i> -0.5685	<i>wagneri/wagneri</i>	<i>spicilegus</i>	0.2222	0.346	0.073	да
	<i>wagneri/spicilegus</i>	<i>wagneri</i>	0.2763	0.292	0.079	да
	<i>wagneri/spicilegus</i>	<i>spicilegus</i>	0.2100	0.358	0.077	да
<i>wagneri/wagneri</i> -моча <i>spicilegus</i> -0.2222	<i>wagneri/spicilegus</i>	<i>wagneri</i>	0.2763	0.054	0.079	нет
	<i>wagneri/spicilegus</i>	<i>spicilegus</i>	0.2100	0.012	0.078	нет
<i>wagneri/spicilegus</i> -моча <i>wagneri</i> -0.2763	<i>wagneri/spicilegus</i>	<i>spicilegus</i>	0.2100	0.066	0.083	нет

родственного вида) реакции на хемосигналы от особой противоположного пола.

В заключение отметим, что фоновый УСТ у самцов двух близкородственных видов *M. spicilegus* (экзоантропный вид) и *M. m. wagneri* (склонен к синантропии, но может обитать в открытых биотопах) различается, он существенно ниже у курганчиковых мышей. Ранний обонятельный опыт и изменение материнской среды модифицируют видоспецифическую активацию гипофизарно-семенникового комплекса у самцов мышей *M. m. wagneri* при экспозиции к запаху мочи рецептивных самок своего вида и вида-воспитателя. Это согласуется с полученными нами ранее результатами, согласно которым нейрональная активация в дополнительной обонятельной луковице (ДОЛ) у самцов *M. m. wagneri*, воспитанных самками *M. spicilegus*, была противоположной по сравнению с самцами, выкормленными конспецифичными самками. Материнская среда, включая запах, оказывала большее влияние на уровень МРТ сигнала в ДОЛ у половозрелых самцов, чем генетическое родство реципиента и донора запаха [11]. Полученные данные свидетельствуют о существенном влиянии условий воспитания на формирование гормональных механизмов репродуктивной изоляции у домашних мышей, а в совокупности с ранее полученными — на изменение поведенческих, нейрональных и гормональных ответов самцов под влиянием раннего опыта и материнской среды. Направленность таких изменений совпадает, что не подтверждает гипотезу об автономности формирования в раннем постнатальном онтогенезе поведенческих и физиологических механизмов, лежащих в основе репродуктивной изоляции у домашних мышей изученных видов.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00303.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание животных после отлова и их умерщвление проведены в соответствии с правилами Европейской конвенции о защите позвоночных. Одобрено Биоэтической комиссией ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН. Протокол № 39 от 27.07.2020 г.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Котенкова Е.В., Мальцев А.Н., Амбарян А.В. Влияние раннего обонятельного опыта на выбор полового партнера у млекопитающих: эволюционные аспекты // Журнал общей биологии. 2017. Т. 78. № 4. С. 21–39.
2. Soini H.A., Wiesler D., Koyama S. et al. Comparison of urinary scents of two related mouse species, *Mus spicilegus* and *Mus domesticus* // Journal of Chemical Ecology. 2009. V. 35. № 5. P. 580–589.
3. Mucignat-Caretta C., Redaelli M.L. et al. Urinary volatile molecules vary in males of the two European subspecies of the house mouse and their hybrids // Chemical Senses. 2010. V. 35. № 8. P. 647–654.
4. Котенкова Е.В. Сравнительный анализ этологических и физиологических механизмов прекопуляционной репродуктивной изоляции у грызунов // Успехи современной биологии. 2014. Т. 135. № 5. С. 488–518.
5. Macrides F., Bartke A., Dalterio S. Strange females increase plasma testosterone levels in male mice // Science. 1975. V. 189. № 4208. P. 1104–1106.
6. Осадчук А.В. Микроэволюционные основы функционирования аденокортикальной и половой систем. В кн.: Онтогенетические и генетико-эволюционные аспекты нейроэндокринной регуляции стресса. Новосибирск: “Наука”. 1990. С. 160–170.
7. Амтиславская Т.Г., Осинцов К.В. Половая активация самцов крыс: поведение и гормональный ответ // Бюллетень СО РАМН. 2003. Т. 109. № 3. С. 112–114.
8. Феоктистова Н.Ю., Кропоткина М.В., Поташикова Е.В. и др. Видообразование у аллопатрических видов хомячков подсемейства Cricetinae (Rodentia, Cricetidae) // Журнал общей биологии. 2018. Т. 79. № 4. С. 262–276.
9. Kotenkova E.V., Osadchuck A.V., Lyalyukhina S.I. Pre-copulatory isolating mechanisms between the house and mound-building mouse // Acta Theriologica. 1989. V. 34. № 22. P. 315–324.
10. Maras P.M., Petrulis A. Olfactory experience and the development of odor preference and vaginal marking in female Syrian hamsters // Physiology and Behavior. 2008. V. 94. № 4. P. 545–551.
11. Kotenkova E., Romachenko A., Ambaryan A., Maltsev A. Effect of early experience on neuronal and behavioral responses to con- and heterospecific odors in closely related *Mus* taxa: epigenetic contribution in formation of precopulatory isolation // BMC Evolutionary Biology. 2019. 19 (Suppl 1): 51.
12. Cheal M. Social olfaction: A review of the ontogeny of olfactory influences on vertebrate behavior // Behavioral Biology. 1975. V. 15. № 1. P. 1–25.
13. Parasuraman S., Raveendran R., Kesavan R. Blood sample collection in small laboratory animals // Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics. 2010. V. 1. № 2. P. 87–93.
14. Patris B., Gouat P., Jacquot C., Christophe N., and Baudoin C. Agonistic and sociable behaviors in the mound-building mouse, *Mus spicilegus*, a comparative study with *Mus musculus domesticus* // Aggressive Behavior. 2002. V. 28. № 1. P. 75–84.

**EARLY POSTNATAL EXPERIENCE MODIFIES ACTIVATION  
OF THE PITUITARY-TESTICULAR COMPLEX  
IN MALE HOUSE MICE (*MUS MUSCULUS*) EXPOSED TO THE ODOR  
OF RECEPTIVE CON- AND HETEROSPECIFIC FEMALES**

**E. V. Kotenkova<sup>a,#</sup>, E. V. Kuznezova<sup>a</sup>, A. N. Maltsev<sup>a</sup>, and A. V. Ambaryan<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Severtsov Institute of Problems of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: evkotenkova@yandex.ru*

For the first time, data were obtained proving the modification of the activation of the pituitary-testicular complex of male house mice under the influence of early postnatal experience and the maternal environment when exposed to the odor of receptive females of their own and closely related species. We have confirmed the conjugacy of the formation of behavioral and physiological mechanisms of precopulatory isolation in early ontogenesis. The serum level of free testosterone in males of closely related species *M. spicilegus* and *M. m. wagneri* differ, it is significantly lower in mound-building mice. The level of free testosterone of males fostered by a conspecific female was significantly lower when they exposed a heterospecific in comparison with a conspecific female odor. The rearing of *M. m. wagneri* males by females of a closely related species caused a decrease in the testosterone response of males to the exposure of chemosignals from a female (both con- and heterospecific) and led to the absence of differences in the serum level of free testosterone when they exposed to the odor of a female of their own or closely related species. The data obtained indicate a significant influence of the rearing conditions on the formation of hormonal mechanisms of reproductive isolation.

*Keywords:* early experience, maternal environment, testosterone level, olfactory signals, isolating mechanisms