

ОБЩАЯ
БИОЛОГИЯ

УДК 599.323.4

МЕХАНИЗМЫ РЕПРОДУКТИВНОЙ ИЗОЛЯЦИИ У ДОМОВЫХ МЫШЕЙ
НАДВИДОВОГО КОМПЛЕКСА *MUS MUSCULUS* S. LATO:
ОТ ПОВЕДЕНИЯ К РЕЦЕПТОРАМ

© 2010 г. А. Е. Вознесенская, А. В. Амбарян, М. А. Ключникова,
Е. В. Котенкова, В. В. Вознесенская

Представлено академиком Э.И. Воробьевой 12.04.2010 г.

Поступило 29.04.2010 г.

В настоящее время исследование рецепторных механизмов действия обонятельных сигналов, лежащих в основе сохранения целостности вида, находится на начальной фазе изучения. Объектами настоящего исследования были два не скрещивающихся в природе симпатрических вида: домовая (*Mus musculus*) и курганчиковая (*M. spicilegus*) мыши, а также лабораторные мыши группы *M. domesticus*. Задачи исследования: 1) сравнительный анализ активации рецепторных клеток вомероназального органа (ВНО) самцов мышей в ответ на стимуляцию запахом эстральной самки своего и чужого видов; 2) сравнительный анализ прохождения обонятельных сигналов особей своего и близкородственных видов от выстилки ВНО до структур центральной нервной системы. В качестве метода, позволяющего визуализировать активные нейроны на срезах рецепторной ткани ВНО и ткани обонятельных луковец в ответ на стимуляцию, был использован метод иммуногистохимического окрашивания с применением первичных антител против белка Fos [1]. Белок Fos является продуктом гена раннего реагирования *c-fos*, экспрессия которого может моментально запускаться посредством различных стимулов, в том числе и деполяризацией клетки [2]. Таким образом, белок Fos может служить маркером активированных нервных клеток.

Время полужизни белка Fos составляет 2 ч, и оптимальная для обнаружения концентрация достигается через 45–90 мин после начала стимуляции в зависимости от конкретных особенностей и локализации нервных клеток [3]. Объектами исследования были молодые половозрелые самцы и самки следующих видов: *M. musculus*, *M. spicile-*

gus, *M. domesticus* (лабораторная форма). Для стимуляции основной и дополнительной обонятельных систем самцов экспонировали к подстилке эстральной самки своего или чужого вида на протяжении 40 мин в прерывистом режиме (1 мин – тестируемый запах, 1 мин – чистый воздух). Для оценки ответа на уровне рецепторной ткани ВНО самцов экспонировали к подстилке эстральной самки своего или чужого видов на протяжении 90 мин [4]. По завершении экспозиции самцы были перфузированы 3%-ным раствором формалина. ВНО извлекали целиком в хрящевой капсуле по методике, разработанной Ч. Вайсоки [5], и фиксировали в формалине на протяжении 2 ч. Фиксацию тканей обонятельных луковец, криопротекцию и иммуногистохимическое окрашивание срезов ткани ВНО и обонятельных луковец проводили по стандартной методике [6]. Мы использовали непрямой авидин-биотиновый метод, в качестве ферментной метки – пероксидазу хрена и диаминобензидин (ДАБ) – в качестве хромогена. Срезы были изготовлены на замораживающем микротоме Triangle Biomedical, толщина срезов – 20 мкм. Окрашивание осуществляли по стандартному трехдневному протоколу с использованием первичных антител производства “Santa Cruz Biotechnology” (США): *c-fos*(4) sc-52 в разведении 1 : 500. Для визуализации и подсчета Fos позитивных клеток был использован микроскоп Nikon® eclipse E400, соединенный с цифровой фотокамерой (Nikon® Coolpix 990). Обработку снимков производили с помощью программ ImageJ (NIH) и Pinnacle studio 8.

Самцов мышей экспонировали к подстилке, содержащей химические сигналы самки. Моча и другие выделения эстральной самки, которые может содержать подстилка, имеют сложный химический состав и включают как летучие соединения, так и вещества с высокой молекулярной массой. Предполагается, что рецепторами нейронов базальной части ВНО воспринимаются соединения белково-пептидной природы, а рецепторы, экспрессирующиеся в апикальной части ВНО

Институт проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова
Российской Академии наук, Москва
Институт проблем передачи информации
им. А.А. Харкевича
Российской Академии наук, Москва

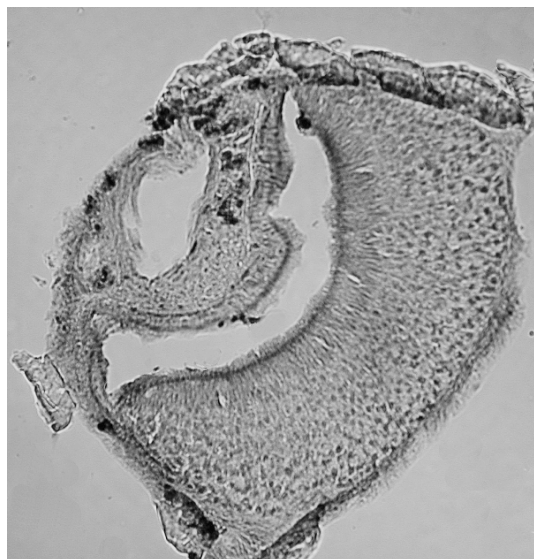


Рис. 1. Нейрональная активность в рецепторном эпителии вомероназального органа самца *M. musculus domesticus* в ответ на стимуляцию химическими сигналами рецептивной самки своего вида. Fos-позитивные нейроны локализованы как в апикальной, так и в базальной зоне сенсорного эпителия.



Рис. 2. Отсутствие активации в рецепторном эпителии вомероназального органа *M. domesticus* в ответ на стимуляцию химическими сигналами рецептивной самки *M. spicilegus*.

ближе к просвету органа, способны связывать как летучие соединения, так и вещества с относительно высокой молекулярной массой (нелетучие) [7, 8]. В ответ на экспозицию подстилки самки *M. domesticus* в эструсе самцу своего вида ($n = 20$) Fos-иммунореактивность в рецепторной ткани ВНО была зарегистрирована как в базальной зоне, так и в апикальной, что соответствует многокомпонентности сигнала (рис. 1). Основная часть Fos-позитивных клеток локализована в ростральной части ВНО. Округлая форма и расположение Fos-позитивных элементов на срезах ВНО позволяет идентифицировать их как ядра рецепторных нейронов ВНО. Этот вывод основан на литературных сведениях об ультраструктуре эпителия ВНО. Ядра основных клеточных элементов нейроэпителия ВНО, рецепторных и опорных клеток имеют различную форму [9, 10]. В ВНО самцов домового мыши, экспонированной к подстилке, взятой от самки, находившейся на стадии диэструса, Fos-иммунореактивность выражена крайне слабо: в рецепторном эпителии присутствовали лишь отдельные окрашенные клетки. На срезах рецепторной ткани ВНО контрольных животных, экспонированных к чистой подстилке, Fos-позитивные клетки отсутствовали ($n = 10$). В ответ на экспозицию подстилки самки *M. spicilegus* в эструсе самцу *M. domesticus* ($n = 8$) иммунореактивность к белку Fos была зарегистрирована, главным образом, в слое опорных клеток, а не рецепторных (рис. 2). Специфический паттерн активации в сенсорном эпителии отсутствовал.

В ответ на экспозицию подстилки самки *M. spicilegus* в эструсе самцу своего вида ($n = 8$) была выявлена Fos-иммунореактивность в рецепторной ткани ВНО преимущественно в базальной зоне (рис. 3). Таким образом, паттерн активации в рецепторной ткани ВНО самцов этих двух видов в ответ на стимуляцию запахом рецептивной самки своего вида имел некоторые различия. Отсутствие специфического паттерна активации в рецепторной ткани в ответ на стимуляцию запахом

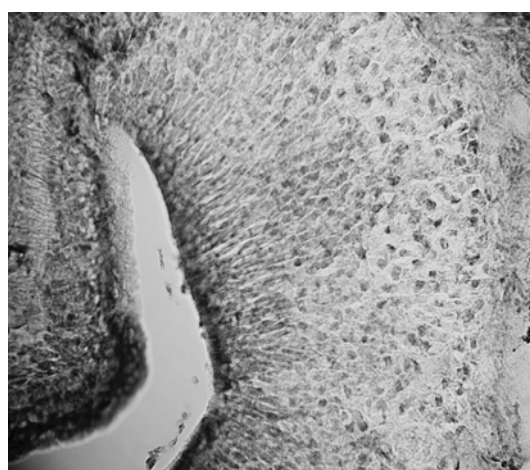


Рис. 3. Нейрональная активность в рецепторном эпителии самца *M. spicilegus* в ответ на стимуляцию химическими сигналами эстральной самки своего вида. Fos-позитивные нейроны расположены, главным образом, в базальной зоне.

чужого вида, по-видимому, может объясняться различным химическим составом, т.е. видоспецифичностью соединений феромональной природы, выделяемых рецептивной самкой. Экспозиция самцам подстилки самки в эструсе как своего, так и чужого вида, вызывала активацию нейронов основной обонятельной луковицы (ООЛ) как в слое гломерул, так и в слое митральных клеток. Причем четкая активация прослеживалась в роstralной и в каудальной частях ООЛ. В ответ на экспозицию самцам подстилки эстральной самки своего вида регистрировался четкий паттерн активации в каудальной части дополнительной обонятельной луковицы (ДОЛ) – в области проекций от базальной зоны ВНО, где экспрессируются рецепторы, предположительно участвующие в восприятии соединений с высокой молекулярной массой [11], у самцов всех трех исследованных видов: *M. musculus*, *M. spicilegus*, *M. domesticus*. В то же время в ответ на экспозицию подстилки эстральной самки *M. spicilegus* самцам *M. musculus* и *M. domesticus* не было зарегистрировано иммунореактивности к белку Fos в ДОЛ. Запах эстральной самки чужого вида не вызывал активации как на уровне рецепторной ткани, так и на уровне соответствующей проекционной зоны ДОЛ. Таким образом, первичный сенсорный анализ биологической значимости сигнала протекает на уровне рецепторной ткани. Это подтверждает точку зрения, согласно которой система ольфакторной коммуникации двух филогенетических групп (синантропных и дикоживущих видов домашних мышей) существенно различается. На основании результатов данного исследования, а также ранее проведенных опытов [12–14] можно сделать следующее заключение. У не скрещивающихся в природе симпатрических видов домашних мышей (*M. musculus* и *M. spicilegus*) прекопуляционная репродуктивная изоляция обеспечивается ее многократным дублированием на разных уровнях организации: от различий в поведении до разницы в рецепторном коде сигнала. Прекопуляционные механизмы изоляции могут действовать на рецепторном уровне, реализуясь в поведенческом ответе от-

дельных особей на обонятельные сигналы, при парных взаимодействиях потенциальных половых партнеров, что обеспечивает надежную репродуктивную изоляцию между симпатрическими видами в естественных условиях.

Исследования поддержаны РФФИ 10–04–01599а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Flavell S.W., Greenberg M.E.* // *Annu. Rev. Neurosci.* 2008. V. 31. P. 563–590.
2. *Sheng M., Greenberg M.E.* // *Neuron.* 1990. V. 4. P. 477–485.
3. *Morgan J.I., Curran T.* // *Annu. Rev. Neurosci.* 1991. V. 14. P. 421–451.
4. *Ambaryan A.V., Voznesenskaia A.E., Kotenkova E.V., Voznessenskaya V.V.* // *Chem. Senses.* 2009. V. 34. № 3. E. 65.
5. *Wysocki C.J., Wysocki L.M.* In: *Experimental Cell Biology of Taste and Olfaction: Current Techniques and Protocols.* Boca Raton (FL): CRC Press, 1995. P. 49–57.
6. *DellaCorte C.* In: *Experimental Cell Biology of Taste and Olfaction: Current Techniques and Protocols.* Boca Raton (FL): CRC Press, 1995. P. 135–142.
7. *Kimoto H., Haga S., Sato K., Touhara K.* // *Nature.* 2005. V. 437. P. 898–901.
8. *Leinders-Zufall T., Brennan P., Widmayer P.S. et al.* // *Science.* 2004. V. 306. P. 1033–1037.
9. *Vaccarezza O.L., Sepich L.N., Tramezzani J.H.* // *J. Anat.* 1981. V. 132. P. 167–185.
10. *Adams D.R.* // *Microsc. Res. Tech.* 1992. V. 23. P. 86–97.
11. *Rodriguez I., Feinstein P., Mombaerts P.* // *Cell.* 1999. V. 97. P. 199–208.
12. *Соколов В.Е., Котенкова Е.В., Лялюхина С.И.* Биология домашней и курганчиковой мышей. М.: Наука, 1990. 207 с.
13. *Амбарян А.В., Котенкова Е.В.* // *Успехи соврем. биологии.* 2008. Т. 128. № 5. С. 199–214.
14. *Voznesenskaia A.E., Ambaryan A.V., Kotenkova E.V., Voznessenskaya V.V.* // *Chem. Senses.* 2005. V. 30. A. 55.