Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7):788-794
DOI 10.18699/VJ17.294

Поведенческие и нейрональные реакции на кон- и гетероспецифические обонятельные сигналы у двух видов мышей – *Mus musculus* и *Mus spicilegus*

Е.В. Котенкова[1] ✉, А.В. Ромащенко[2, 3], А.Н. Мальцев[1]

[1] Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Россия
[2] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[3] Институт вычислительных технологий Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Исследованы поведенческие и нейрональные ответы самцов двух близкородственных видов мышей (*Mus musculus wagneri* и *M. spicilegus*) на запах мочи самок своего и близкородственного видов в состоянии эструса. Поведенческие тесты, проведенные с помощью методики парного предъявления источников запаха, показали, что самцы достоверно дольше исследуют запах самок-конспецификов по сравнению с запахом гетероспецификов. Для исследования нейрональной активации в основной и дополнительной обонятельных луковицах (ОЛ) использовали один из методов функциональной томографии – марганец-усиленную магнитно-резонансную томографию (МУ МРТ). При предъявлении самцам *M. m. wagneri* и *M. spicilegus* запаха конспецифичной самки по сравнению с самцами контрольной группы (запах не экспонировали) наблюдалось достоверное увеличение накопления Mn^{2+} в дорсальном отделе задней части основной ОЛ. При экспозиции запаха гетероспецифичной самки локальное достоверное увеличение накопления контраста происходило в дорсальной области передней части основной ОЛ. Запах гептанона-2 не только вызывал увеличение накопления контраста в определенных зонах, но и значительно снижал накопление Mn^{2+} в остальной части ОЛ. У самцов наблюдалось достоверное увеличение накопления МРТ-контраста в дополнительной ОЛ только в случае предъявления запаха мочи самок-конспецификов. Результаты работы подтверждают высказанное ранее предположение о существенной разнице между системами химической коммуникации у двух видов мышей. При сопоставлении данных этого исследования с ранее полученными не выявлено различий в поведенческих и нейрональных реакциях у аллопатрически (*M. m. wagneri*) и симпатрически (*M. m. musculus*) распространенных с *M. spicilegus* подвидов домовой мыши. Это не позволяет предполагать действие в процессе эволюции механизма «усиления» при формировании прекопуляционной репродуктивной изоляции между симпатрическими видами *M. spicilegus* и *M. musculus*.

Ключевые слова: домовые мыши; *M. spicilegus*; *M. musculus*; обонятельные сигналы; марганец-усиленная томография; дополнительная обонятельная система; основная обонятельная система.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:
Котенкова Е.В., Ромащенко А.В., Мальцев А.Н. Поведенческие и нейрональные реакции на кон- и гетероспецифические обонятельные сигналы у двух видов мышей – *Mus musculus* и *Mus spicilegus*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7):788-794. DOI 10.18699/VJ17.294

HOW TO CITE THIS ARTICLE:
Kotenkova E.V., Romashchenko A.V., Maltsev A.N. Behavioral and neuronal responses of two mouse species, *Mus musculus* and *Mus spicilegus*, to con- and heterospecific olfactory signals. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):788-794. DOI 10.18699/VJ17.294 (in Russian)

УДК 599.591.5; 57.08
Поступила в редакцию 06.10.2017 г.
Принята к публикации 30.10.2017 г.
© АВТОРЫ, 2017

✉ e-mail: evkotenkova@yandex.ru

Behavioral and neuronal responses of two mouse species, *Mus musculus* and *Mus spicilegus*, to con- and heterospecific olfactory signals

E.V. Kotenkova[1] ✉, A.V. Romashchenko[2, 3], A.N. Maltsev[1]

[1] Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Moscow, Russia
[2] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
[3] Institute of Computational Technologies SB RAS, Novosibirsk, Russia

The behavioral and neuronal responses of the males of two closely related species of mice (*Mus musculus wagneri*, *M. spicilegus*) to the urine odors of estrus con- and heterospecific females were studied. In two-choice odor tests males significantly longer investigated odor of conspecific females in comparison with heterospecific ones. To investigate neuronal activation in the main and accessory olfactory bulbs (MOB and AOB), one of the methods of functional tomography – manganese-enhanced MRI (ME-MRI) – was used. There was a significant increase in Mn^{2+} accumulation in the dorsal section of the posterior part of the MOB in male *M. m. wagneri* and *M. spicilegus* exposed to odor of conspecific females compared with the control group males (odor not exposed). There was a local significant increase in manganese accumulation in the dorsal region of the anterior part of the MOB in the case of the exposure of odor of a heterospecific female. The exposure of heptanone-2 to mice resulted not only in an increase in Mn^{2+} accumulation in certain zones, but also in a significant decrease in the accumulation of Mn^{2+} in the rest of the olfactory bulbs. A significant increase in the accumulation of MRI contrast in AOB was observed in males only in the case of female urine-conspecific odor exposure. The results support the previously stated assumption of a significant difference in chemical communication systems in two species of mice. A comparison of these results and results obtained previously demonstrated the absence of any differences in behavioral and neuronal responses to con- and heterospecific odors of the house mouse subspecies allopatric (*M. m. wagneri*) and sympatric (*M. m. musculus*) to *M. spicilegus*. This fact does not allow us to assume the effect of the mechanism of "reinforcement" in the process of evolution in the formation of precopulatory reproductive isolation between the sympatric species *M. spicilegus* and *M. musculus*.

Key words: house mice; *M. spicilegus*; *M. musculus*; olfactory signals; manganese-enhanced tomography; additional olfactory system; main olfactory system.

Химическая коммуникация – ведущая форма обмена информацией у большинства видов мелких грызунов, при этом реакция на обонятельные сигналы может носить врожденный характер или формироваться и модифицироваться в результате раннего опыта (Doty, 2010; Суров, Мальцев, 2016; Котенкова и др., 2017). Мыши всех видов надвидового комплекса *Mus musculus* sensu lato распознают по запаху представителей своего и близкородственных видов независимо от их возраста и половой принадлежности, что лежит в основе выбора конспецифичного полового партнера, а, следовательно, и функционирования механизмов прекопуляционной этологической изоляции (Котенкова, 2014). Близкородственные виды домовых мышей при парном предъявлении достоверно дольше исследуют или остаются около источника запаха конспецификов по сравнению с гетероспецификами (Соколов и др., 1990; Kotenkova, Naidenko, 1999; Heth et al., 2001). Существенная значимость обонятельных сигналов как механизмов прекопуляционной изоляции показана для симпатрических видов домовых мышей (*M. musculus* и *M. spicilegus*) (Соколов и др., 1990; Kotenkova, Naidenko, 1999; Вознесенская и др., 2010). Способность различать запахи особей своего и других близких аллопатрических, парапатрических и симпатрических видов выявлена и у других таксонов домовых мышей (Christophe, Baudoin, 1998; Kotenkova, Naidenko, 1999; Smadja, Ganem, 2008). При использовании метода иммуногистохимического окрашивания с применением первичных антител против белка Fos для визуализации нейрональной активности в сенсорном эпителии вомероназального органа (ВНО) у самцов *M. domesticus* и *M. spicilegus* в ответ на экспозицию запаха самок-гетероспецификов в состоянии эструса выявлен специфический паттерн активации. При экспозиции самки близкородственного вида активация отсутствовала (Вознесенская и др., 2010). Эти различия, по-видимому, могут объясняться неодинаковым химическим составом, т. е. видоспецифичностью феромонов и/или феромональных смесей, выделяемых рецептивными самками. Экспозиция самцам подстилки самки в эструсе как своего, так и другого вида вызывала активацию нейронов основной обонятельной луковицы (ОЛ) как в слое гломерул, так и в слое митральных клеток. В ответ на экспозицию подстилки эстральной самки-конспецифика у самцов трех видов (*M. musculus*, *M. spicilegus* и *M. domesticus*) регистрировался четкий паттерн активации в каудальной части дополнительной ОЛ (Вознесенская и др., 2010) – в области проекций от базальной зоны ВНО, где экспрессируются рецепторы, предположительно участвующие в восприятии соединений с высокой молекулярной массой (Rodrigues et al., 1999). Запах эстральной самки другого вида не вызывал активации как на уровне рецепторной ткани, так и на уровне соответствующей проекционной зоны дополнительной ОЛ. Таким образом, первичный сенсорный анализ биологической значимости сигнала протекает у симпатрических видов мышей на уровне рецепторной ткани ВНО (Вознесенская и др., 2010). Эти данные наряду с найденными существенными различиями химического состава мочи *M. domesticus* и *M. spicilegus* (Soini et al., 2009) подтверждают ранее высказанную точку зрения, согласно которой системы ольфакторной коммуникации двух филогенетических групп (синантропных и экзоантропных видов домовых мышей) существенно различаются (Котенкова, Амбарян, 2003).

Одним из химически идентифицированных феромонов домовых мышей является гептанон-2 – метаболит надпочечников, обнаруженный в моче лабораторных мышей синантропных видов *M. musculus* и *M. domesticus* (Novotny et al., 1986; Mucignat-Caretta et al., 2010) и вызывающий удлинение продолжительности эструсовых циклов у самок лабораторных мышей (Jemiolo et al., 1989). Это вещество обнаружено в моче интактных (не кастрированных) самцов *M. spicilegus* в низкой концентрации (Soini et al., 2009). Несет ли это соединение функцию феромона не только у лабораторных линий мышей, но и у *M. spicilegus* и *M. musculus*, не известно (Котенкова, 2014). Мы экспонировали *M. spicilegus* и *M. musculus* к гептанону-2, чтобы сравнить активацию нейронов основной и дополнительной ОЛ в ответ на это соединение. Наличие активации в дополнительной ОЛ может служить косвенным указанием на феромональную функцию данного соединения у этих видов.

В работе мы использовали один из методов функциональной томографии – марганец-усиленную магнитно-резонансную томографию (МУ МРТ) для исследования активности ольфакторных нейронов самцов *M. m. wagneri* и *M. spicilegus* в ответ на экспозицию запаха мочи самок кон- и гетероспецификов. Метод МУ МРТ основан на свойствах ионов Mn^{2+}, которые являются агонистами потенциал-зависимых кальциевых каналов и способны проникать через них внутрь клетки (Aoki et al., 2004). Поскольку марганец относится к парамагнетикам, с помощью МРТ возможно оценивать его накопление в исследуемой ткани. Показано, что уровень активности клеток ткани в ответ на стимул будет прямо пропорционален уровню МРТ-сигнала, который зависит от степени активности кальциевых каналов (Koretsky, Silva, 2004). Задачи данной работы состояли, во-первых, в выявлении у самцов двух видов мышей наличия (отсутствия) предпочтения запаха мочи конспецифичных самок по сравнению с гетероспецифичными в состоянии эструса; во-вторых, в изучении особенностей активации нейронов в основной и дополнительной ОЛ у этих видов мышей в ответ на кон- и гетероспецифические обонятельные сигналы самок в состоянии эструса и гептанон-2.

Материалы и методы

Подопытные животные. Работа выполнена на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики СО РАН и на научно-экспериментальной базе «Черноголовка» Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (ИПЭЭ РАН) с использованием коллекции животных ЦКП «Живая коллекция диких видов млекопитающих» ИПЭЭ РАН. В поведенческих опытах использовано семь самцов *M. m. wagneri* $F_{2–4}$ лабораторного разведения от особей, отловленных в Астраханской области, и 12 самцов *M. spicilegus* лабораторного разведения F_1 от зверьков, отловленных в Ростовской области, в возрасте 4–6 мес. Эксперименты с использованием МУ МРТ проводили на самцах мышей в возрасте 4–8 мес. с массой тела 28–32 г.

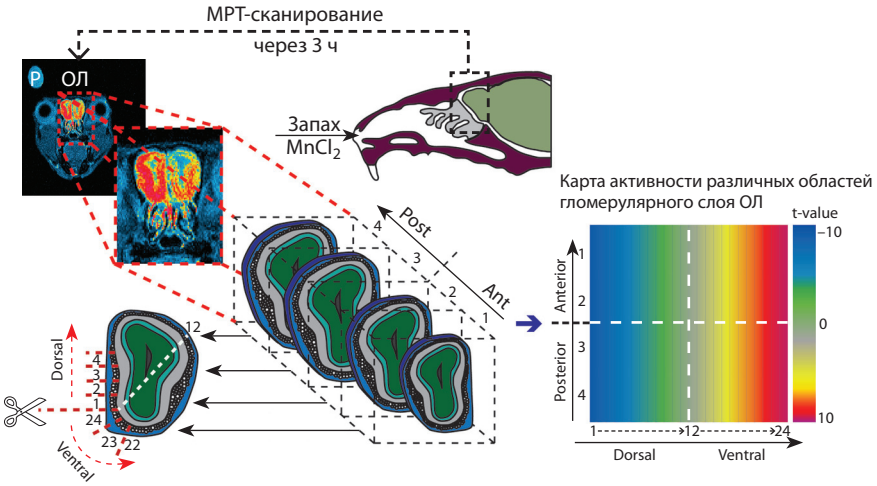

Рис. 1. Схематичное изображение процедуры обработки МРТ-сканов, полученных с помощью МУ МРТ, и генерирования карты активности основной ОЛ мыши в ответ на запаховый стимул.

В опытах использовано 15 самцов *M. m. wagneri*, $F_{2–4}$ лабораторного разведения от зверьков, отловленных в Астраханской области, и 15 самцов *M. spicilegus*, отловленных при раскопке курганчиков в Ростовской области. За пять дней до начала экспериментов самцов рассаживали по одному в стандартные пластиковые ванночки (25 × 20 × 15 см), а за один час до начала исследования – в стандартные индивидуальные клетки (35 × 25 × 12 см) в вентилируемом помещении при температуре 22–24 °C. Брикетированный корм («Чара», Павловский Посад) и воду мыши получали *ad libitum*. Подстилочным материалом служили обеспыленные древесные опилки.

В качестве запаховых стимулов использовали мочу самок в состоянии эструса. Донорами мочи были половозрелые, не знакомые экспериментальным самцам самки, которых содержали группами по три-четыре особи. Эструс вызывали искусственно последовательными инъекциями 0.06 мл 0.1 % масляного раствора синестрола, а затем через 36–48 ч – 0.06 мл 0.1 % раствора прогестерона. Самцам предъявляли мочу, слитую от четырех-пяти самок. Мочу собирали в пробирки Эппендорфа размером 1.5 мл от доноров при взятии их в руки или высаживании в специальные клетки из сетки (12 × 6 × 6). После сбора мочу замораживали. Перед проведением серии опытов мочу размораживали, повторное замораживание и использование мочи не проводили. Стадию полового цикла самок определяли по влагалищным мазкам, взятым перед сбором мочи (Киршенблат, 1971).

Поведенческие опыты. Применяли методику парного предъявления запахов мочи в чашках Петри, подробно описанную в предыдущих публикациях (Соколов и др., 1983; Kotenkova, Naidenko, 1999). Кратко она заключалась в следующем. За пять дней перед проведением экспериментов зверьков рассаживали поодиночке в стеклянные камеры (30 × 20 × 20 см) с сетчатой крышкой. Опыты проводили в этих же камерах с периодичностью один раз в четыре-семь дней при слабом искусственном освещении в период максимальной вечерней активности животных – с 20 до 23 ч. В один конец камеры помещали круглую пластмассовую подставку диаметром 130 мм и высотой 30.5 мм, на нее ставили две чашки Петри диаметром 40 мм. Перед началом опыта в каждую из них наносили мочу доноров (20 мкл), затем ставили на подставку на расстоянии примерно 30 мм друг от друга. С помощью секундомера в течение 5 мин фиксировали время обнюхивания каждого источника запаха после естественного пробуждения зверька, первого подхода и обнюхивания одного из запахов. (Наблюдатель не знал, моча каких особей находилась в чашках Петри во время опыта.)

Опыты с использованием магнитно-резонансной томографии. Проведены серии экспериментов, в которых самцам экспонировали запах мочи самок в следующих сочетаниях: самцам *M. spicilegus* – самок *M. spicilegus*; самцам *M. spicilegus* – самок *M. m. wagneri*; самцам *M. m. wagneri* – самок *M. m. wagneri*; самцам *M. m. wagneri* – самок *M. spicilegus*; контрольные опыты с самцами *M. m. wagneri* и *M. spicilegus* (без экспозиции запахов). В каждой серии использовано по пять самцов. Кроме того, четырем самцам *M. spicilegus* и четырем самцам *M. m. wagneri* после перерыва в 10 сут экспонировали гептанон-2 при разведении 1:10 (Sigma Aldrich, США).

При исследовании накопления марганца в ОЛ ненаркотизированным животным вводили по 10 мкл 0.01M раствора $MnCl_2$ в одну ноздрю. Каждое животное поочередно помещали обратно в клетку, на стенке которой была прикреплена пробирка с запаховым стимулом (12 мкл мочи). Экспозиция запахового стимула продолжалась в течение 20 мин, после чего пробирку убирали из клетки с животным. МРТ-сканирование ОЛ проводили через 3 ч после интраназальной апликации мараганца. Накопление Mn^{2+} в ОЛ оценивали с помощью T1-взвешенных МРТ-изображений. Подобные временные рамки были выбраны на основе предварительных экспериментов и данных литературы (Chuang et al., 2009), ввиду того, что через 3 ч паттерны накопления Mn^{2+} в ОЛ в ответ на запаховый стимул наиболее ярко выражены. Томографические исследования проводили по ранее разработанному протоколу, подробно описанному в работе (Ромащенко и др., 2017). Накопление ионов марганца в клетках ОЛ выражали как отношение уровня МРТ-сигнала в исследуемых структурах к уровню МРТ-сигнала в референсе, которым служила микропробирка с фосфатным буфером (0.5 мл), помещенная вдоль головы мыши. Предварительную обработку МРТ-сканов проводили в программе ImageJ, состоящей из нескольких этапов: выравнивание изображений по горизонтали, выделение границ мозга мыши, изменение размеров изображения. Выравнивание геометрии и размеров мозга позволило проводить автоматическое сравнение уровня МРТ-сигнала в дополнительной ОЛ и в отдельных областях основной ОЛ у разных осо-

бей. Для проведения анализа полученных результатов глобулярный слой обонятельных луковиц на каждом срезе был условно разделен на 25 областей (рис. 1).

Таким образом, исходное разрешение МРТ-скана было уменьшено до 250 мкм × 250 мкм × 0.5 мм. В пределах этих 25 областей уровень МРТ-сигнала усреднялся, после чего проводили различные межгрупповые сравнения и, таким образом, оценивали изменения нейрональной активности в ответ на запаховый стимул. Для визуализации полученных результатов использовали двухмерную «карту» ольфакторной луковицы, где по оси абсцисс располагали номер области (1–25), а по оси ординат – номер среза (1–4), с помощью псевдоокрашивания кодировали значение *t*-критерия Стьюдента, характеризующего достоверность отличий двух групп (см. рис. 1).

Статистическую обработку данных поведенческих экспериментов проводили с помощью непараметрического критерия Вилкоксона в пакете программ STATISTICA 6.0 и критерия знаков.

При обработке данных томографирования для сравнения двух средних использовали *t*-тест Стьюдента. Для множественных сравнений средних использовали LSD-тест (Least Significant Difference). Для оценки взаимозависимостей исследуемых признаков использовали параметрический коэффициент корреляции Пирсона. Сравнение паттернов активации при предъявлении различных запаховых стимулов проводили с помощью иерархической кластеризации (Chuang et al., 2009). Данные выражали как средние ± SE.

Результаты

Самцы двух видов мышей достоверно дольше исследовали запах самок своего вида в состоянии эструса по сравнению с запахом самок близкородственного вида. Самцы *wagneri* в 11 из 13 опытов дольше исследовали запах мочи самок-конспецификов по сравнению с самками *spicilegus*, различия достоверны по критерию знаков, $p = 0.05$; время исследования самок-конспецификов в секундах было (среднее/мин/макс): 9.1/1.3/23.1; гетероспецификов – 3.3/1.1/7.3, $p < 0.01$ по критерию Вилкоксона. Самцы *spicilegus* в 11 из 15 опытов дольше исследовали запах мочи самок-конспецификов по сравнению с самками *wagneri*, различия достоверны по критерию знаков, $p = 0.01$; время исследования самок-конспецификов 15.4/0.8/32.8, гетероспецификов 2.0/0.3/6.1, $p < 0.001$.

Активность нейронов обонятельного эпителия и ВНО самцов *M. m. wagneri* и *M. spicilegus* оценивали, исходя из уровня МРТ-сигнала в гломерулярном слое основной ОЛ и в нейронах дополнительной ОЛ (рис. 2, *а*).

При предъявлении самцам *M. m. wagneri* и *M. spicilegus* запаха конспецифичной самки по сравнению с самцами контрольной группы наблюдалось достоверное увеличение накопления Mn^{2+} в дорсальном отделе задней части ОЛ, а при экспозиции запаха гетероспецифичной самки – в дорсальной области передней части ОЛ. Экспонирование к запаху гептанона-2 приводило не только к увеличению накопления контраста в определенных зонах, но и к значительному снижению накопления Mn^{2+} в остальной части ОЛ (см. рис. 2, *а*). У самцов *M. spicilegus* предъявление гептанона-2 вызывало увеличение накопления МРТ-контраста в вентральной области задней части ОЛ, у *M. m. wagneri* – в дорсальной области ОЛ (см. рис. 2, *а*). На рис. 2, *б* приведены тепловые карты накопления ионов марганца в ОЛ при сравнении ответов на запаховые стимулы между собой. Анализ накопления Mn^{2+} в дополнительной ОЛ показал, что у обоих видов наибольший ответ клеток ВНО вызывало предъявление в качестве запахового стимула гептанона-2 (рис. 3).

У самцов *M. m. wagneri* и *M. spicilegus* наблюдалось достоверное увеличение накопления МРТ-контраста в дополнительной ОЛ только в случае предъявления запаха мочи самок конспецифичного вида (см. рис. 3).

Обсуждение

Как уже отмечалось выше, представители симпатрических форм *M. m. musculus* и *M. spicilegus* достоверно дольше исследуют запах особей своего вида (Соколов и др., 1983). Реакция самцов аллопатрически распространенных *M. m. wagneri* и *M. spicilegus* была сходной, т. е. они достоверно дольше исследовали запах конспецифичных самок в состоянии эструса по сравнению с гетероспецифичными. Таким образом, не выявлено какой-либо разницы в поведенческой реакции на кон- и гетероспецифические запахи самок у самцов, симпатричных и аллопатричных с *M. spicilegus* форм *M. musculus*.

С помощью метода МУ МРТ нами охарактеризована реакция основного обонятельного эпителия и нейронов ВНО самцов *M. spicilegus* и *M. m. wagneri* на запах мочи кон- и гетероспецифичных самок, а также гептанона-2 высокой концентрации. Как отмечалось ранее, гептанон-2 – феромон, вызывающий удлинение продолжительности эструсовых циклов у самок лабораторных мышей (Jemiolo et al., 1989). Распознавание этого пахучего вещества осуществляется рецепторами как ВНО, так и обонятельного эпителия (Leinders-Zufall et al., 2000; Хохлов и др., 2009). У двух исследованных нами видов мышей достоверная реакция дополнительной обонятельной системы наблюдалась только при предъявлении запаха конспецифичной самки. Это соответствует ранее полученным данным при использовании другого подвида *M. m. musculus* методом иммуногистохимического окрашивания с применением первичных антител против белка Fos (Вознесенская и др., 2010). Активация основной ОЛ в ответ на запах мочи кон- и гетероспецифичных самок оказалась гораздо менее выражена, чем на гептанон-2, как у самцов *M. spicilegus*, так и у самцов *M. m. wagneri*. Результаты по нейрональной активации в основной ОЛ самцов при экспозиции им запаха кон- и гетероспецифичных самок в состоянии эструса несколько отличаются от ранее полученных методом иммуногистохимического окрашивания. При использовании в экспериментах синантропных видов мышей *M. m. musculus* и *M. domesticus* (лабораторные мыши) и экзоантропного вида *M. spicilegus* при экспонировании подстилки самок в состоянии эструса как своего, так и другого вида прослеживалась четкая активация в ростральной и каудальной частях основной ОЛ (Вознесенская и др., 2010). В наших экспериментах мы наблюдали у самцов *M. m. wagneri* и *M. spicilegus* локальное увеличение накопления контраста в дорсальной области передней части ОЛ в ответ на предъявление запаха гетероспеци-

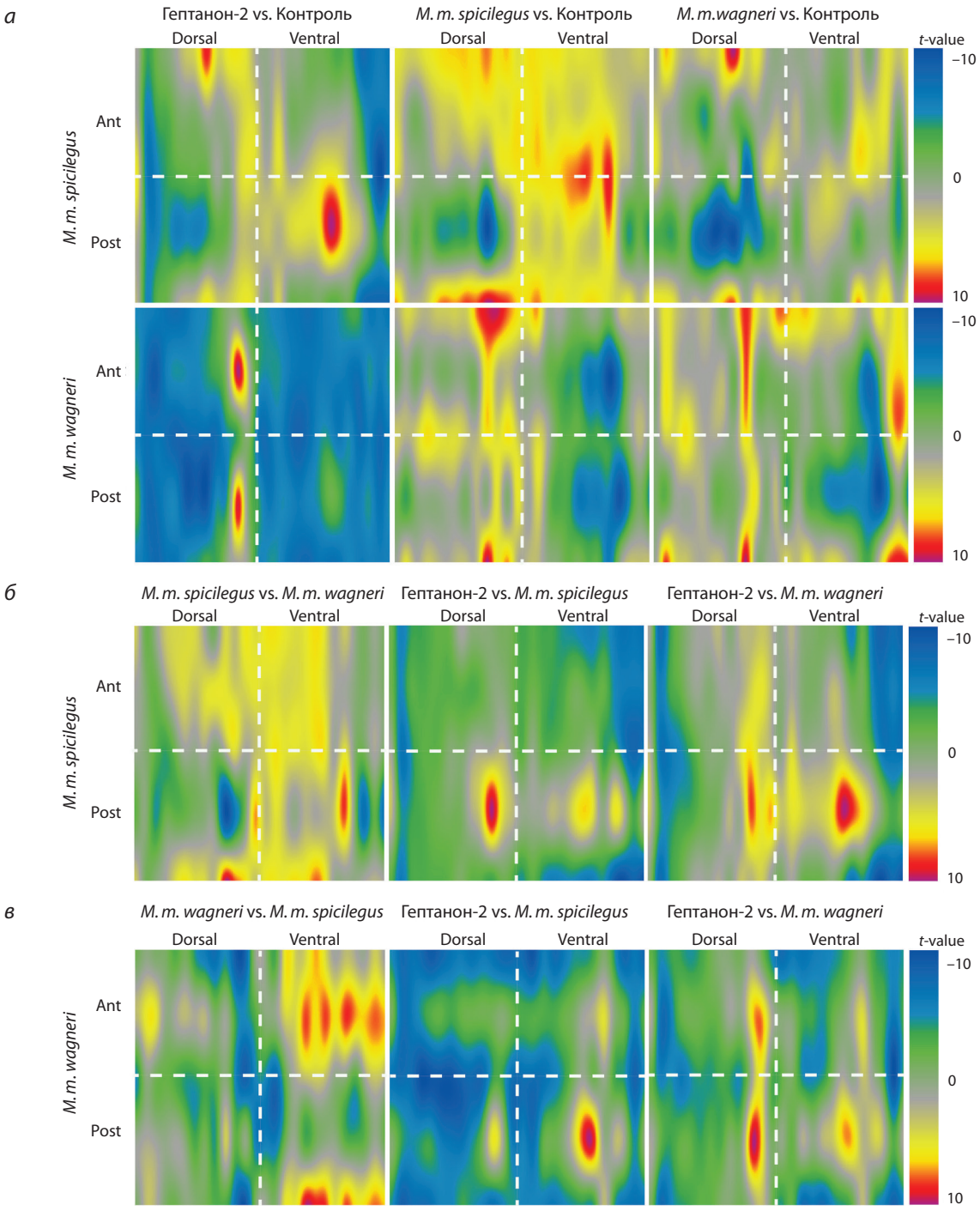

Рис. 2. Паттерны накопления ионов марганца в различных отделах основной ОЛ самцов *M. spicilegus* и *M. m. wagneri* в ответ на предъявление запаха мочи кон-/гетероспецифичной самки или гептанона-2.

а–в – псевдоокрашивание отражает достоверность увеличения ($t > 0$, где t – значение t-критерия Стьюдента при попиксельном сравнении средних по группе значений сигнала в ОЛ мышей) или уменьшения ($t < 0$) интенсивности накопления контраста в различных отделах ОЛ в ответ на ольфакторный стимул по сравнению с контрольной группой без запаха (*а*) или по сравнению с реакцией на другой запаховый стимул (*б*, *в*).

фика и в дорсальной области задней (каудальной) части ОЛ при экспозиции запаха мочи конспецифика. В данном исследовании у самцов паттерны накопления контраста в основной ОЛ при предъявлении мочи кон- и гетероспецифичных самок достоверно коррелируют. Различия результатов могут быть обусловлены разницей химического состава мочи у *M. m. wagneri* и *M. m. musculus*.

Таким образом, с одной стороны, с помощью МУ МРТ удалось продемонстрировать специфичность ответа дополнительной обонятельной системы на запах мочи конспецифика противоположного пола, что соответствует ранее полученным данным. С другой стороны, с помощью этого метода нам удалось показать локализацию ответа на запахи кон- и гетероспецификов в области основной ОЛ,

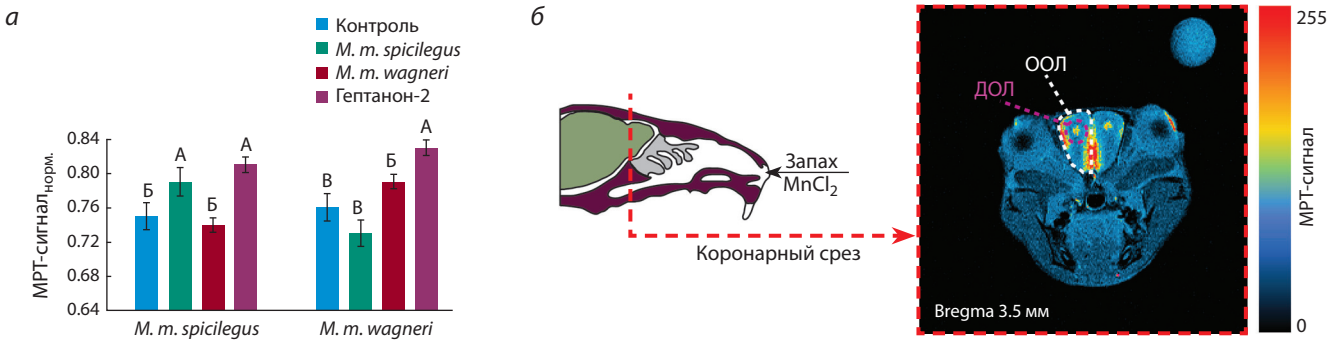

Рис. 3. Активация нейронов дополнительной ОЛ самцов *M. spicilegus* и *M. m. wagneri* в ответ на предъявление запаха мочи кон-/гетероспецифичной самки или гептанона-2.

а – в качестве критерия оценки реакции нейронов ОЛ на запаховый стимул использовали интенсивность накопления ионов марганца (II), которая пропорциональна уровню МРТ-сигнала в данной области; *б* – Т1-взвешенное изображение накопления МРТ-контраста в ОЛ в ответ на запаховый стимул. ДОЛ – дополнительная ОЛ; ООЛ – основная ОЛ; А, Б, В – достоверность отличий средних значений (LSD-тест, $p < 0.05$).

реагирующей на наиболее значимые социальные стимулы, такие как запах хищника и запах корма (Bolon et al., 1991; Kobayakawa et al., 2007). Следует отметить, что довольно долго считалось, что вомероназальная система в эволюционном плане сформировалась как специализированная для восприятия социально значимых для животных сигналов – феромонов и феромональных смесей (Wysocki, 1979; Liman, 1996). Это подтверждается и тем фактом, что все известные на сегодняшний день феромоны домовых мышей воспринимаются дополнительной обонятельной системой (Tirindelli et al., 2009; Котенкова, 2014). Однако результаты исследований последних лет показали, что провести столь четкое разделение функций невозможно, а основная и дополнительная обонятельные системы, скорее, дополняют друг друга при распознавании разных сигналов (Kelliher, 2007; Tirindelli et al., 2009; Baum, 2012). Выявлена активация в гломерулярном слое основной ОЛ мышей и крыс при экспозиции соединений, описанных ранее как феромоны мышей (Хохлов и др., 2009; Johnson et al., 2009). В связи с этим полученные нами данные о разной локализации нейрональных ответов на кон- и гетероспецифические обонятельные сигналы, связанные с размножением как в основной, так и дополнительной обонятельной системах, представляют особый интерес и открывают дальнейшие перспективы для изучения данной проблемы.

В настоящее время опубликованы результаты ряда исследований, посвященных картированию пространственного представительства рецепторов, воспринимающих разные одоранты, в ОЛ (Mori et al., 2006; Johnson et al., 2009), в том числе полученные с помощью метода функциональной томографии (Xu et al., 2003; Schafer et al., 2006). Одна из задач такого картирования – выявление видоспецифичности хемотопической организации (chemotopic organization) ОЛ. При этом исследования, выполненные на лабораторных мышах и крысах, показали наличие различий между этими видами (Johnson et al., 2009), которые, с точки зрения зоолога-эволюциониста, сложно назвать близкородственными. В нашем исследовании выявлены различия в ответ на экспозицию к гептанону-2 у двух действительно близкородственных видов мышей. Как уже отмечалось выше, у самцов *M. spicilegus* предъявление гептанона-2 вызывало увеличение накопления МРТ-контраста в вентральной области задней части ОЛ, у *M. m. wagneri* – в дорсальной области ОЛ. Ранее у мышей C57BL/6J, линии, генетически близкой к *M. domesticus*, показана активация в дорсально расположенных гломерулах в ответ на гептанон-2 высокой концентрации (Johnson et al., 2009), что совпадает с полученными нами данными для *M. m. wagneri*. Поскольку запах гептанона-2 вызывал активацию нейронов как основной, так и дополнительной ОЛ, возможно, что это соединение несет феромональные функции и у исследованных нами видов. Это предположение, безусловно, нуждается в экспериментальной проверке.

Заключение

Полученные результаты подтверждают высказанное ранее на основании данных изучения поведенческих ответов на кон- и гетероспецифические запахи предположение о существенной разнице систем химической коммуникации у двух симпатрических видов мышей (Котенкова, Амбарян, 2003). При сопоставлении результатов этого исследования с ранее полученными не выявлено различий в поведенческих и нейрональных реакциях у аллопатрически (*M. m. wagneri*) и симпатрически (*M. m. musculus*) распространенных с *M. spicilegus* подвидов домовой мыши. Это не позволяет предполагать действие в процессе эволюции механизма «усиления» при формировании прекопуляционной репродуктивной изоляции между симпатрическими видами *M. spicilegus* и *M. musculus*. По-видимому, выявленные существенные различия систем химической коммуникации этих видов сформировались в условиях аллопатрии, еще до того, как эти виды стали симпатрическими.

Благодарности

Исследования поддержаны грантом Российского научного фонда (№ 16-14-10269) и выполнены с использованием оборудования ЦКП, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Вознесенская А.Е., Амбарян А.В., Ключникова М.А., Котенкова Е.В., Вознесенская В.В. Механизмы репродуктивной изоляции у домовых мышей надвидового комплекса *Mus musculus* s. lato: от поведения к рецепторам. Докл. Акад. наук. 2010; 435(3):417-419.

Киршенблат Я.Д. Основы эндокринологии. М., 1971.

Котенкова Е.В. Сравнительный анализ этологических и физиологических механизмов прекопуляционной репродуктивной изоляции у грызунов. Усп. совр. биологии. 2014;135(5):488-518.

Котенкова Е.В., Амбарян А.В. Этологические механизмы репродуктивной изоляции у домовых мышей надвидового комплекса Mus musculus s.l. Усп. совр. биол. 2003;123(6):599-608.

Котенкова Е.В., Мальцев А.Н., Амбарян А.В. Влияние раннего обонятельного опыта на выбор полового партнера у млекопитающих: эволюционные аспекты. Журн. общ. биол. 2017;78(4): 21-39.

Ромащенко А.В., Петровский Д.В., Мошкин М.П. Конгруэнтность интраназальной аэродинамики и функциональной неоднородности ольфакторного эпителия. Журн. общ. биол. 2017;78(1):15-24.

Соколов В.Е., Котенкова Е.В., Лялюхина С.И. Биология домовой и курганчиковой мышей. М., 1990.

Соколов В.Е., Лялюхина С.И., Котенкова Е.В. Сравнительное изучение реакции на обонятельные сигналы домовых и курганчиковых мышей (Rodentia, Muridae). Зоол. журн. 1983;62(9):1394-1398.

Суров А.В., Мальцев А.Н. Анализ химической коммуникации млекопитающих: зоологический и экологический аспекты. Зоол. журн. 2016;95(12):1449-1458.

Хохлов А.А., Романов Р.А., Рогачевская О.А., Садовников В.Б., Колесников С.С. Возможная роль гистдуцин-положительных сенсорных клеток обонятельного эпителия в восприятии 2-гептанона. Сенсорные системы. 2009;23(2):164-171.

Aoki I., Wu Y.J.L., Silva A.C., Lynch R.M., Koretsky A.P. In vivo detection of neuroarchitecture in the rodent brain using manganese-enhanced MRI. Neuroimage. 2004;22(3):1046-1059.

Baum M.J. Contribution of pheromones processed by the main olfactory system to mate recognition in female mammals. Front. Neuroanat. 2012;6(20). DOI 10.3389/fnana.2012.00020.

Bolon B., Bonnefoi M.S., Roberts K.C., Marshall M.W., Morgan K.T. Toxic interactions in the rat nose: pollutants from soiled bedding and methyl bromide. Toxicol. Pathol. 1991;19(4):571-579.

Christophe N., Baudoin C. Olfactory preferences in two strains of wild mice, *Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*, and their hybrids. Anim. Behav. 1998;56(2):365-369.

Chuang K.H., Lee J.H., Silva A.C., Belluscio L., Koretsky A.P. Manganese enhanced MRI reveals functional circuitry in response to odorant stimuli. Neuroimage. 2009;44(2):363-372.

Doty R.L. The Great Pheromone Myth. Baltimore MD: Johns Hopkins University Press, 2010.

Heth G., Todrank J., Busquet N., Baudoin C. Odour-genes covariance and differential investigation of individual odours in the Mus species complex. Biol. J. Linn. Soc. 2001;73(2):213-220.

Jemiolo B., Andreolini F., Xie T.M., Wiesler D., Novotny M. Puberty-affecting synthetic analogs of urinary chemosignals in the house mouse, *Mus domesticus*. Physiol. Behav. 1989;46(2):293-298.

Johnson B.A., Xu Z., Ali S.S., Leon M. Spatial representations of odorants in olfactory bulbs of rats and mice: similarities and differences in chemotopic organization. J. Comp. Neural. 2009;514(6): 658-673.

Kelliher K.R. The combined role of the main olfactory and vomeronasal sestems in social communication in mammals. Horm. Behav. 2007;52(5):561-570.

Kobayakawa K., Kobayakawa R., Matsumoto H., Oka Y., Imai T., Ikawa M., Okabe M., Ikeda T., Itohara S., Kikusui T. Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. Nature. 2007; 450(7169):503-508.

Koretsky A.P., Silva A.C. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). NMR Biomed. 2004;17(8):527-531.

Kotenkova E.V., Naidenko S.V. Discrimination of con- and heterospecific odors in different taxa of the Mus musculus species group: Olfactory cues as precopulatory isolating mechanism. Eds R.E. Johnston, D. Müller-Schwarze, P.N.Y. Sorensen. Advances Chemical Communication Vertebrates. N. Y: Plenum Press, 1999;299-308.

Leinders-Zufall T., Lane A.P., Puche A.C., Ma W., Novotny M.V., Shipley M.T., Zufall F. Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. Nature. 2000;405(6812):792-796.

Liman E.R. Pheromone transduction in the vomeronasal organ. Curr. Opin. Neurobiol. 1996;6(4):487-493.

Mori K., Takahashi Y.K., Igarashi K.M., Yamaguchi M. Maps of odorant molecular features in the mammalian olfactory bulb. Physiol. Rev. 2006;86(2):409-433.

Mucignat-Caretta C., Redaelli M.L., Orsetti A., Perriat-Sanguinet M., Zagotto G. Urinary volatile molecules vary in males of the two European subspecies of the house mouse and their hybrids. Chem. Senses. 2010;35(8):647-654.

Novotny M., Jemiolo B., Harvey S., Wiesler D., Marchlewska-Koj A. Adrenal-mediated endogenous metabolites inhibit puberty in female mice. Science. 1986;231(4739):722-725.

Rodriguez I., Feinstein P., Mombaerts P. Variable patterns of axonal projections of sensory neurons in the mouse vomeronasal system. Cell. 1999;97(2):199-208.

Schafer J.R., Kida I., Xu F., Rothman D.L., Hyder F. Reproducibility of odor maps by fMRI in rodents. Neuroimage. 2006;31(3):1238-1246.

Smadja C., Ganem G. Divergence of odorant signals within and between the two European subspecies of the house mice. Behav. Ecol. 2008;19(1):223-230.

Soini H.A., Wiesler D., Koyama S., Féron C., Baudoin C., Novotny M.V. Comparison of urinary scents of two related mouse species, *Mus spicilegus* and *Mus domesticus*. J. Chem. Ecol. 2009;35(5): 580-589.

Tirindelli R., Dibattista M., Pifferi S., Menini A. From pheromones to behaviour. Physiol. Rev. 2009;89(3):921-956.

Wysocki C.J. Neurobehavioral evidence for the involvment of the vomeronasal system in mammalian reproduction. Neurosci. Biobehav. Rev. 1979;3(4):301-341.

Xu F., Liu N., Kida I., Rothman D.L., Hyder F., Shepherd G.M. Odor maps of aldehydes and esters revealed by functional MRI in the glomerular layer of the mouse olfactory bulb. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003;100(19):11029-11034.