

М. Шу

На правах рукописи

Ключникова Мария Александровна

**РОЛЬ ЛЕТУЧИХ СТЕРОИДОВ (НА ПРИМЕРЕ
АНДРОСТЕНОНА) В РЕГУЛЯЦИИ АГРЕССИВНОГО
ПОВЕДЕНИЯ У ДОМОВОЙ МЫШИ**

03.00.28 – биоинформатика

03.00.13 - физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2009

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Вознесенская Вера Васильевна

Официальные оппоненты:

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Бастаков Владимир Антонинович
(Учреждение Российской академии наук
Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН)

доктор биологических наук, доцент
Котенкова Елена Владимировна
(Учреждение Российской академии наук
Институт проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова РАН)

Ведущая организация:

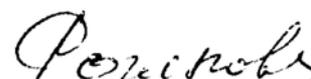
Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики СО РАН

Защита диссертации состоится 11 июня 2009 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 002.077.02 при Учреждении Российской академии наук Институте проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН по адресу: 127994, г. Москва, ГСП-4, Большой Каретный переулок, д.19. стр. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН

Автореферат разослан « » _____ 2009 года

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор Рожкова Г.И



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Агрессивное поведение играет важную роль в процессах адаптации животных к окружающей среде. Межсамцовая агрессия у домовый мыши во многом определяет характер отношений доминирования-подчинения, организацию популяционной структуры и характер избирательности скрещивания, как в естественных местообитаниях домовый мыши, так и в лабораторных популяциях (Poole, Morgan, 1973, Новиков, 1988). Сходство ряда элементов агонистического поведения человека и животных свидетельствует об их общих биологических основах.

Лабораторная мышь - превосходный модельный объект для исследований в области генетики и биомедицины человека (Silver, 1995). Около 90% генов человека имеет свои гомологи у мыши, соответственно, верно и обратное суждение. Прочтение первичной последовательности генома мыши было в черновом варианте завершено в 2002 году (Waterston RH et al, 2002), однако дополнение и аннотация нуклеотидных последовательностей продолжается и по сей день, что отражается в постоянном обновлении специализированных баз данных (например, MGI, NCBI). Важным инструментом для реализации общего подхода к идентификации генов по пути «от фенотипа к гену» является метод картирования локусов количественных признаков, основанный на анализе ассоциаций между генетическими маркерами и проявлением фенотипических признаков. Выявление связи поведенческих признаков с отдельными локусами и генами отвечает задаче аннотации генома на более высоком уровне.

Исследования на мышах роли химических сигналов в регуляции агрессивного поведения представляют особый интерес. Участие химических сигналов в регуляции различных типов социального, в том числе и агрессивного поведения, было продемонстрировано для различных видов млекопитающих (Brennan, Kendrick, 2006; Halpern, Martinez-Marcos, 2003). В современном представлении, химические сигналы млекопитающих, к которым относят и феромоны, это отдельные химические вещества или смеси, выделяемые одной особью и оказывающие влияние на другую особь того же вида, т.е. участвующие в коммуникации (Johnston, 2001). На сегодняшний день выделен ряд химических соединений, участвующих в регуляции агрессивного поведения у домовый мыши, однако ни одно из этих веществ не имитирует полностью информационный сигнал естественных биологических смесей (Novotny et al, 1986; Chamero et al., 2007). Известно, что естественные химические сигналы, провоцирующие агрессивное поведение, имеют андроген-зависимый характер (Mugford, Nowell, 1970, Novotny et al 1985, Novotny et al 1990, Novikov 1993, Chamero et al 2007). Вещества стероидной природы, как метаболиты гормонов,

циркулирующих в организме и отражающих состояние особи, могут быть рассмотрены в качестве кандидатов на роль естественных сигналов в регуляции социального поведения домового мыши (Zahavi, 1975, Ingersoll, Launay, 1986, Nodari et al, 2008).

В качестве модельного одоранта в наших исследованиях был использован стероид гонадного происхождения андростенон (5α -андрост-16-ен-3-он), наиболее известный как половой феромон хряка (Reed et al, 1974). Андростенон является и кандидатом на роль модуляторного феромона у человека (Cowley, et al., 1977, Filsinger, et al., 1984, Pause, 2004). У 30-50% в популяции людей наблюдается специфическая anosmia к андростенону, т.е. неспособность распознавать именно этот запах на фоне нормальной чувствительности к другим одорантам (Wysocki and Labows, 1984). Функциональное значение этой, одной из самых распространенных у человека, anosmii неясно. Специфические anosmii предоставляют возможность связать обонятельную функцию с конкретными рецепторами и генами (Keller et al, 2007, Griff and Reed, 1995).

Генетическая модель специфической anosmii к андростенону была разработана при сотрудничестве научных групп Ч. Вайсоки и В.В. Вознесенской на основе 2-х инбредных линий мышей NZB/B1NJ и CBA/J, высококонтрастных по этому признаку (Voznessenskaya et al, 1995). Малочувствительные к андростенону мыши линии NZB/B1NJ имеют очень высокий уровень агрессивности по сравнению со многими другими инбредными линиями (Roubertoux and Carlier, 1986, Roubertoux et al, 2005) и, в частности, с CBA/J (Voznessenskaya, Wysocki, 2000). Согласно нашей гипотезе, хемодифицит к летучим стероидам у домового мыши может приводить к ошибкам в распознавании запахового сигнала, несущего информацию о половой принадлежности и социальном статусе, что, в свою очередь, может служить одной из причин проявления избыточной межсамцовой агрессии.

Цель исследования. Целью данной работы было моделирование на примере андростенона связи между обонятельной чувствительностью к летучим стероидам и социальным поведением у домового мыши, а также исследование значимости летучих стероидов в качестве хемосигналов.

Задачи исследования. Были сформулированы следующие задачи:

1. Анализ наследования обонятельной чувствительности к летучим стероидам и межсамцовой агрессии с использованием модели специфической anosmii к андростенону, включая картирование отдельных генетических локусов и моделирование одновременного участия нескольких генетических факторов, контролирующих эти признаки, а также поиск генов-кандидатов по базам данных.

2. Исследование связи между чувствительностью к летучим стероидам и способностью распознавать по химическим сигналам пол и репродуктивный статус особей своего вида на уровне поведения на модели специфической аносмии к андростенону.

3. Исследование участия дополнительной обонятельной системы в рецепции этого одоранта на модели специфической аносмии к андростенону.

4. Исследование на уровне гормонального и поведенческого ответа информационной значимости андростенона как хемосигнала у домашней мыши.

Научная новизна. Впервые на основе генетического анализа гибридов второго поколения от скрещивания инбредных линий мышей CBA/J и NZB/B1NJ определены хромосомные локусы, оказывающие влияние на такие признаки, как обонятельная чувствительность к летучему стероиду андростенону и межсамцовая агрессия. Впервые на модели специфической аносмии к андростенону показано отсутствие предпочтения запаха эстральной самки по сравнению с запахом самца у самцов мышей с хемодифицитом к летучим стероидам. Впервые показано участие дополнительной обонятельной системы в детекции андростенона. Впервые на модели специфической аносмии к андростенону был получен ответ на стимуляцию андростеноном на уровне рецепторной ткани вомероназального органа. Впервые показано, что предъявление андростенона (0.1%, 30 мин), вызывает снижение уровня тестостерона в плазме крови у самцов домашней мыши.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные результаты способствуют накоплению и интеграции данных о фенотипических признаках у инбредных линий мышей и генетических локусах, контролирующих обонятельную чувствительность к летучим стероидам (на примере андростенона), а также межсамцовую агрессию, расширяя сведения существующих баз данных. Полученные данные позволяют подойти ближе к пониманию биологических основ специфической аносмии к андростенону и агрессивного поведения у человека. Обонятельная функция человека рассматривается как перспективный маркер ряда нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезни Альцгеймера, паркинсонизма и др. (Doty et al, 2008, Atanasova et al, 2008).

В естественной среде обитания домашние мыши наносят существенный экономический вред хозяйству и являются переносчиками опасных инфекционных заболеваний (Кулик, 1979). Исследование информационной значимости летучих стероидов в регуляции агрессивного и полового поведения грызунов позволяет оптимизировать применение сигнальных молекул на практике как естественных репеллентов и/или регуляторов репродуктивной функции.

Апробация работы. Материалы работы были представлены на конференциях молодых сотрудников и аспирантов института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова в 2006 и 2008 году, на 11-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» 29 октября – 2 ноября 2007 года, IV Всероссийской конференции по поведению животных 29 октября - 1 ноября 2007 года, на XI международной конференции по химическим сигналам позвоночных (Chester, UK, July, 25-28, 2006), на 17-м и 18-м конгрессах европейской организации по исследованию хеморецепции (17-th ECRO Congress, Granada, Spain, September, 4-8, 2006; 18-th ECRO Congress, Portoroz, Slovenia, September, 3-7, 2008), на 29-м Международном ежегодном съезде ассоциации по хеморецептивным наукам (AChemS, Sarasota, USA, April, 25-29, 2007).

Апробация диссертационной работы прошла на семинаре лаб. Сравнительной нейробиологии позвоночных ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН 26 февраля 2009 года.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация имеет объем _____ страниц и состоит из введения, литературного обзора, главы о материалах и методах исследования, результатов с их обсуждением, заключения, выводов и списка литературы. Работа проиллюстрирована _____ рисунками, включает _____ таблиц и 4 приложения. В списке литературы процитировано _____ источников.

Исследования частично поддержаны РФФИ 07-04-01538 и Программой Президиума РАН "Динамика генофондов и генетическое разнообразие".

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материалы и методы исследований

Животные. Были использованы мыши инбредных линий CBA/Lac и CBA/J (мыши этих сток, по нашим данным, однородны по фенотипическим признакам агрессивного поведения и чувствительности к андростенону), NZB/B1NJ и BALB/c, гибриды F₁ и F₂ кросса CBAхNZB, белые и цветные мыши гетерогенной лабораторной популяции. Животных содержали в стандартных условиях вивария.

Генетические методы. При реципрокном скрещивании мышей родительских линий CBA/J и NZB/B1NJ было получено два типа гибридов первого поколения: ♀CBA X ♂NZB (далее обозначены как CN, первой буквой зашифрован генотип материнской линии) и ♀NZB X ♂CBA (NC). После скрещивания самцов и самок гибридов F₁ в различных комбинациях были произведено 4 типа реципрокных гибридов второго поколения, соответственно CN/NC (CN – генотип матери, NC – генотип отца), CN/CN, NC/NC, NC/CN. Для генетического анализа признаков, помимо анализа фенотипов родительских линий и гибридов, был использован метод

картирования локусов количественных признаков, или анализ QTL (QTL – quantitative trait locus). Метод основан на ассоциации комплексных фенотипических признаков с ДНК-маркерами. Были использованы данные фенотипирования (полученные совместно с Вознесенской В.В.) о порогах чувствительности к андростенону, определенных на основе пищедобывательного рефлекса с положительным пищевым подкреплением у 42 мышей родительских линий, 44 гибридов F₁ и 119 гибридов F₂, а также показатели межсамцовой агрессии (латентный период первой атаки, среднюю и максимальную интенсивность атак), оцененные в стандартном 6 минутном тесте на межсамцовую агрессию, у 31 мышей родительских линий, 25 гибридов F₁ и 178 гибридов F₂. У 64 гибридов F₂ были определены оба фенотипических признака. Для анализа фенотипических признаков были использованы дисперсионный анализ, тест Колмогорова-Смирнова на нормальность распределения, непараметрический коэффициент корреляции Спирмана (Statistica 7). ДНК выделяли из хвостов мышей при помощи NaOH/Трис метода (Truett, et al., 2000), а также готовых наборов Puregene DNA Purification Kit (QIAGEN-Gentra, США). Для гибридов F₂ были получены результаты по генотипированию 99 микросателлитных маркеров и 41 SNP маркера, полиморфных для родительских линий, расположенных на всех аутосомах и X хромосоме (среднее расстояние между маркерами около 12 cM). В качестве контролей использовали образцы ДНК родительских линий и гибридов F₁. Генотипирование осуществляли в Маршфильдовском центре (США) и центре генотипирования Kbiosciences (Англия). Наиболее вероятный порядок маркеров был установлен при помощи программы MAPMAKER/EXP v.3.0. Анализ ассоциаций между отдельными фенотипами и ДНК-маркерами у гибридов второго поколения кросса NZBxСВА проводили при помощи алгоритмов, включенных в пакет анализа R/QTL версии 1.10-27, доступный в среде программирования R v.2.8.1 (Broman, et al., 2003). Генетические карты хромосом были построены в этой же программе, с допущением 1% ошибки генотипирования. В качестве статистического критерия для представления результатов использовали LOD (logarithm of the odds ratio) оценку. Пороги для представления достоверных сцеплений вычисляли для всего генома при помощи пермутационных тестов (Churchill and Doerge, 1994). Р-уровень для предположительных сцеплений был принят за 0.63, а для достоверных локусов – за 0.05 (Lander and Kruglyak, 1995). Проводили простое сканирование генома в модели с одиночным QTL (EM-алгоритм, Dempster et al, 1977), а также с включением дополнительных аддитивных и интерактивных ковариат. Сканирование генома с включением аддитивной ковариаты обнаруживает QTL, которые дают сходный эффект у всех групп, определяемых ковариатой (например, у самцов и самок), но

имеющих различные средние значения фенотипических оценок. Включение интерактивной ковариаты позволяет выявить ассоциации, присутствующие у одной, но не у другой выделенной группы (например, у самцов, но не у самок), или же имеющие разнонаправленные эффекты в этих группах. Неаддитивные (эпистатические) взаимодействия между локусами были определены при сканировании генома в модели с двумя QTL. В качестве теста на эпистаз использовали оценку LODint (вычисляется как разница между LODfull - оценкой для полной модели и LODadd - оценкой для аддитивной модели), взаимодействия были включены в результаты в том случае, если LODfull превышала порог для предположительных сцеплений ($p < 0.63$), а LODint, в то же время, – для достоверных ($p < 0.05$). Найденные эффекты ($p < 0.63$) были использованы для анализа в модели с множественными QTL (регрессия, backward elimination – исключение в обратном порядке). Подобная логика анализа была успешно применена в ряде исследований (Solberg, et al., 2004, Sugiyama, et al., 2002). Поиск генов, локализованных в областях обнаруженных локусов проводили при помощи он-лайн базы данных Positional Medline Database (PosMed) <http://omicspace.riken.jp/PosMed/>

Андростенон (АНД) (5α -андрост-16-ен-3-он, Sigma, США). Для приготовления стокового 0.1% (w/v) раствора использовали очищенное минеральное масло (Sigma, США). Батарейку растворов АНД разной концентрации для определения порогов обонятельной чувствительности готовили последовательными бинарными разведениями 0.1% раствора.

Методы тестирования поведения. Пороги чувствительности к АНД определяли на основе модифицированной методики обучения с положительным пищевым подкреплением, в тесте «спрятанного печенья» (Voznessenskaya et al, 1999)

Уровень межсамцовой агрессии оценивали при помощи стандартного теста ссаживания с кастрированным самцом-интродером (Fuller and Hahn, 1976). В качестве оценочных показателей были выбраны латентный период первой атаки, время агрессивного поведения, интенсивность атак, оцененная по 4-х балльной шкале.

В стандартном тесте на предпочтение запаха эстральной самки в клетку мыши помещали на 10 мин два образца: один с 20 мкл мочи эстральных самок, а другой с 20 мкл мочи самцов BALB/c. Регистрировали время исследования каждого образца.

Для оценки ориентировочно-исследовательской реакции использовали модификацию «hole board» теста «открытое поле» (Hole, 1934). Регистрировали: количество стоек, количество исследованных «норок», количество дефекаций, количество актов груминга и продолжительность груминга.

Хирургическое удаление вомероназального органа. Вомероназальный орган (ВНО) удаляли через ротовую полость мыши под наркозом (нембутал, 25 мг/кг). После завершения тестирования поведения проводили иммуногистохимическую (*c-fos*) верификацию полноты удаления эпителия ВНО по степени деградации гломерул в дополнительной обонятельной луковице. (Wysocki, Wysocki, 1995).

Исследование нейрональной активности в обонятельной системе. Активацию нервных клеток в структурах обонятельной системы определяли по экспрессии генов раннего реагирования *c-fos*. Экспозицию к одорантам проводили при продувании в прерывистом режиме 1 мин “on”/ 1 мин “off” в течение 1.5 ч. После этого мышей под наркозом (нембутал, 40 мг/кг) перфузировали физиологическим раствором, а затем 3% раствором параформальдегида. ВНО и обонятельные луковицы проводили через растворы сахарозы: 10% - 20% - 30% (по 24 ч). Срезы толщиной 30 мкм готовили на замораживающем микротоме TBS (США). Окрашивали по стандартному протоколу визуализации белка Fos при помощи ферментной метки – пероксидазы хрена, краситель 3,3-диаминобензидин (Sigmafast). Первичные антитела к белку Fos - Santa Cruz Biotechnology inc, США, все остальные реактивы и антитела - фирмы Vector Lab.(США). Срезы исследовали при помощи микроскопа Nikon eclipse E400, соединенного с цифровой фотокамерой (Nikon Coolpix 990). Обработку снимков проводили с помощью ПО ImageJ (NIH).

Определение содержания гормонов в плазме крови методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). После 30 мин предъявления образцов запахов в домашних клетках, кровь животных на протяжении 1-2 –ух мин отбирали в пробирки, покрытые гепарином и солями лития (Sarstedt). Плазму крови отделяли центрифугированием (15 мин 12000g). Мы использовали готовые наборы реактивов (DRG, Германия): тестостерон (EIA-1559) и кортикостерон (EIA-4164), планшетный спектрофотометр SpectraMax 340PC³⁸⁴, программное обеспечение SpectraMax Software (Molecular Devices, США).

Стандартные статистические методы. Данные обрабатывали при помощи ПО Microsoft Excel 2000 и Statistica 7. Использовали критерии параметрической и непараметрической статистики. Принятый уровень достоверности $p < 0.05$.

Результаты

Генетический анализ признаков чувствительности к андростенону и параметров межсамцовой агрессии

Фенотипы

родительских линий и гибридов F₁.

Чувствительность к андростенону (АНД). Мыши линии NZB/B1NJ, как самцы, так и самки, достоверно менее чувствительны к

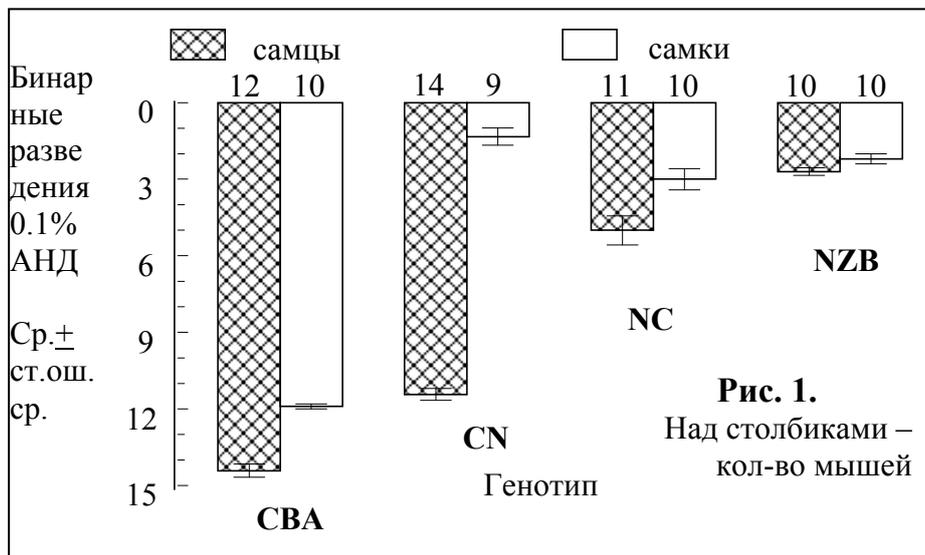


Рис. 1.

Над столбиками – кол-во мышей

андростенону. Разница в чувствительности между родительскими линиями NZB/B1NJ и CBA/J, определенная при помощи поведенческих тестов, оценивается, по крайней мере, в 2000 раз (Voznessenskaya and Wysocki, 1994). У гибридов F₁ наблюдалась разница в чувствительности между самцами реципрокных кроссов. Самцы CN (мать CBA/J, отец NZB/B1NJ) лучше детектируют андростенон, чем самцы NC. Самки обеих кроссов малочувствительны к андростенону. Двухфакторный дисперсионный анализ (главные эффекты – пол и генотип) данных, представленных на рис. 1 показал значительное влияние генотипа $F(3,78) = 436, p < 0.001$, пола $F(1,78) = 277, p < 0.001$ (самки менее чувствительны, чем самцы) и взаимодействие между этими двумя эффектами $F(3,78) = 277, p < 0.001$.

Межсамцовая агрессия. Самцы линии NZB/B1NJ, наряду с хемодефицитом к андростенону, демонстрировали повышенную агрессивность по отношению к кастрированному самцу-интродеру в стандартном 6 минутном тесте по сравнению с самцами линии CBA/J. Мы наблюдали статистически достоверные отличия ($p < 0.05$)

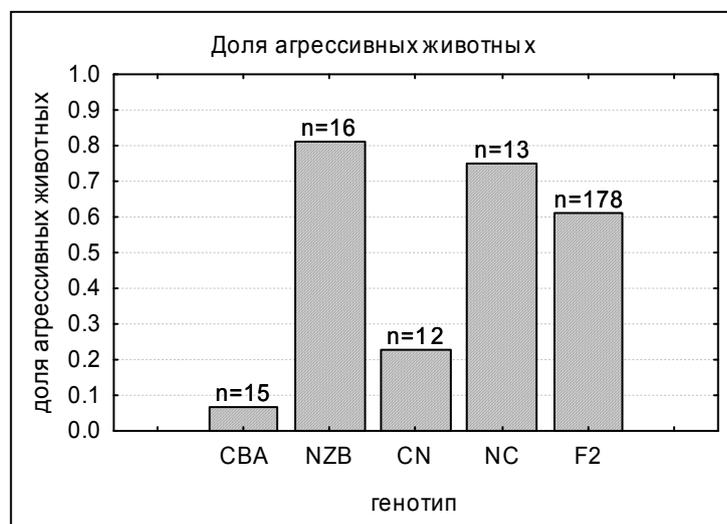


Рис. 2. Над столбиками обозначено количество мышей

по оцененным параметрам межсамцовой агрессии как между исходными родительскими линиями, так и между реципрокными гибридами первого поколения (см. рис 2, таблицу 2).

Более агрессивные самцы кросса NC (мать NZB/B1NJ) были менее чувствительны к АНД, что

повторяет закономерность,

описанную для родительских линий.

Предпочтение запаха эстральной самки. Самцы домовых мышей предпочитают запах эстральной самки как запаху самки в диэструсе, так и запаху самца. В этом эксперименте мы использовали половозрелых сексуальноопытных самцов линий NZB/B1NJ (n=8) и CBA/Lac(n=8). Самцы CBA достоверно дольше (критерий Вилкоксона, $p < 0.05$) исследовали образец мочи эстральной самки, чем образец самца. У самцов NZB/B1NJ мы не наблюдали предпочтения запаха эстральной самки. Самцы CBA/Lac суммарно уделяли во время теста больше времени образцам мочи, чем самцы NZB/B1NJ (критерий Манна-Уитни, $P < 0.05$).

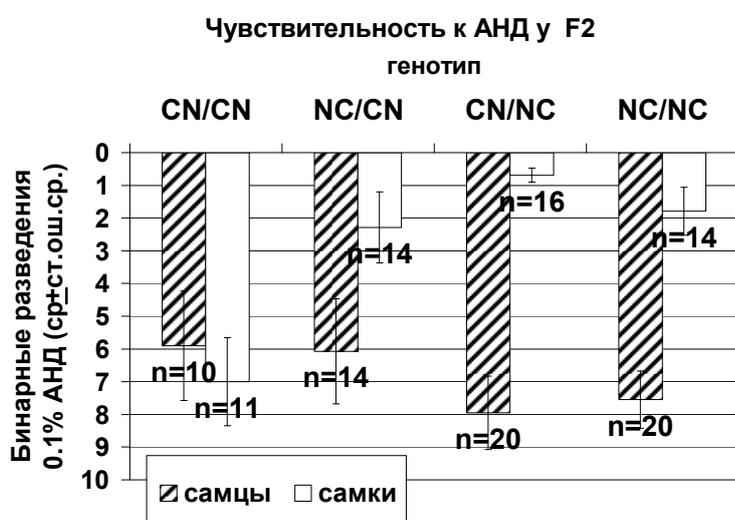
Таблица 1. Тест на предпочтение эстральной самки

Линия и пол тестируемого животного	Время исследования образца мочи мышей BALB/c, ср +/- ст. ош. ср, с		
	Самцов	Эстр. самок	Суммарное
Самцы CBA/Lac	81.8±10.7	193.0 ± 25.3 $p < 0.05$	274.8±22.2
Самцы NZB/B1NJ	62.9±16.7	73.4±19.7 $p = 0.48$, н.д	136.25 $P < 0.05$
Самки CBA/Lac (в эструсе)	54.6±13.7	46.2±14.8 $p = 0.33$ н.д	106.1±31.5
Самки NZB/B1NJ (в эструсе)	36.2±13.9	29.4±7.4 $p = 0.80$, н.д	65.6±19.5 $P = 0.31$ н.д.

Мы протестировали и самок этих линий (в состоянии эструса). Для самок NZB/B1NJ (n=10) и CBA/Lac (n=10) отмечены только тенденции к предпочтению запаха самца (см. таблицу 1).

Примечание: p - уровень достоверности (критерий Вилкоксона для зависимых выборок для сравнения показателей животных одного пола и линии), P - уровень достоверности (критерий Манна-Уитни для суммарного времени исследования у мышей одного пола, но разных линий), н.д. - недостоверно

Рис. 3.



Фенотипы

гибридов F₂

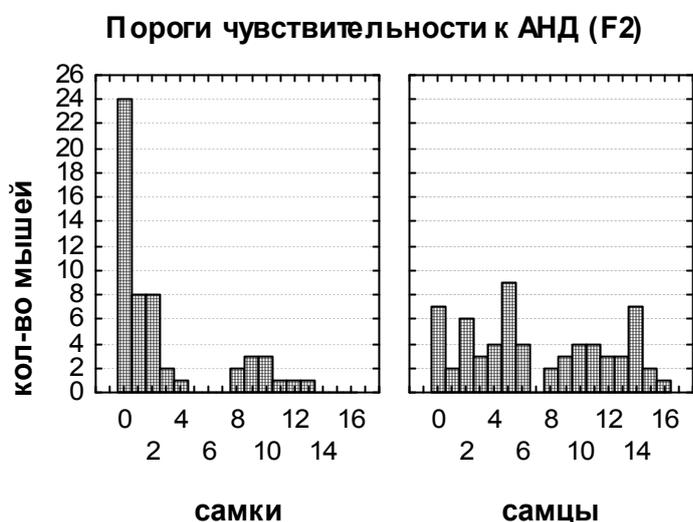
Чувствительность к андростенону. Распределение значений порогов чувствительности к андростенону достоверно отличалось от нормального как для всей выборки животных (n=119), так и отдельно для самцов и самок (тест Колмогорова-Смирнова,

$p < 0.01$, рис.4). Двухфакторный дисперсионный анализ чувствительности гибридов F₂

к андростенону (главные факторы - пол и генотип) выявил эффект пола $F(1, 111)=24.03$, $p<0.0001$ (самки менее чувствительны, чем самцы), отсутствие эффекта генотипа $F(3, 111)=1.41$, $p=0.24$, и взаимодействие между этими эффектами ($F(3, 111)=4.58$, $p=0.005$) (рис. 3).

Сравнивая между собой отдельные группы животных (ANOVA, post hoc тест Дункана), мы получили, что: 1) все 4 группы самцов не различаются между собой ($p>0.25$), 2) 3 группы самок (NC/CN, CN/CN и NC/NC) менее чувствительные к андростенону не различаются между собой, но каждая из них достоверно отлична от группы самок CN/CN ($p<0.01$ для всех сравнений), 3) эти же 3 группы самок (NC/CN, CN/CN и NC/NC) достоверно отличаются от всех 4-х групп самцов ($p<0.05$ для всех сравнений), 4) более чувствительная к андростенону группа самок CN/CN не

Рис. 4. отличалась от всех групп самцов ($p>0.5$).



Межсамцовая агрессия. По показателям агрессивного поведения не было различий между реципрокными гибридами в F₂. По ряду параметров мы наблюдали достоверные различия между группами самцов, выделенными по «происхождению» (CN/NC+NC/NC и CN/CN + NC/CN) (см. таблицу 2).

Таблица 2. Показатели агрессивного поведения для P, F₁, F₂.

Показатель и/группы	ЛП, с	ЛП, с 360*	Ср. интенсивность атак, баллы	Макс. интенсивность атак, баллы	% Агрессивных животных
Родительские линии и гибриды F₁					
NZB/B1NJ (n=15)	122.5+/-32.9	212.1+/-54.9	1.25+/-0.31	1.69+/-0.21	81.30%
СВА/J (n=16)	300	580+/-20 ****	0.07+/-0.07 ****	0.07+/-0.07 ****	6.70%
NC (n=13)	83.8+/-25.5	212.8+/-70.0	1.38+/-0.33	1.5+/-0.36	75%
CN (n=12)	220+/-20 ##	512.3+/-46.4 ##	0.35+/-0.21 ##	0.38+/-0.24 #	23.10%
Гибриды второго поколения					

Все F₂ (n=179)	112.2+/-8.7	209.1+/-10.5	1.35+/-0.09	1.52+/-0.10	60.90%
CN/CN (n=51)	126.6+/-16.6	204.4+/-19.1	1.29+/-0.15	1.49+/-0.18	66.70%
NC/CN (n=43)	121.8+/-16.3	254.8+/-19.6	1.00+/-0.19	1.16+/-0.22	44.20%
NC/NC (n=43)	105.3+/-16.8	182.3+/-21.5	1.50+/-0.18	1.70+/-1.20	69.70%
CN/NC (n=42)	94.3+/-18.4	195.5+/-23.1	1.62+/-0.21	1.74+/-0.22	61.90%
ANOVA (Ф-р К)	P=0.5	P=0.09	P=0.10	P=0.18	
ANOVA (ф-р П)	P=0.07	P=0.03	P=0.03	P=0.06	

Примечание: ЛП – латентный период 1-й атаки, ЛП, 360 – неатаковавшим самцам присвоено значение 360 с. Отмечены статистически значимые различия между родительскими линиями (****- $p < 0.0001$) и реципрокными гибридами F₁ (#- $p < 0.05$, ##- $p < 0.01$), по критерию Манна-Уитни. Ф-р – фактор, К – тип реципрокных гибридов F₂, П – «происхождение» F₂.

Корреляции. Большинство оцененных показателей агрессивного поведения сильно коррелировали между собой, что позволяет обсуждать их вместе. Коэффициенты корреляции между чувствительностью к АНД и параметрами агрессивного поведения в F₂ были близки к 0 (см. таблицу 3).

Таблица 3. Корреляционные коэффициенты Спирмана (гибриды F₂).

	1	2	3	4	5
ЛП 1-й атаки – «1»			-0.13 н.д.	-0.35*	0.05 н.д.
ЛП 1-й атаки, 360 с – «2»			-0.80*	-0.86*	0.03 н.д.
Средняя интенсивность атак – «3»	-0.13	-0.80*		0.96*	0 н.д.
Максимальная интенсивность атак – «4»	0.35*	-0.86*	0.96*		0.09 н.д.
Чувствит. к АНД – «5»	0.05 н.д.	0.03 н.д.	0 н.д.	0.09 н.д.	

Примечание: ЛП – латентный период, ЛП, 360 – неатаковавшим самцам присвоено значение 360 с, *- $p < 0.05$, н.д. - недостоверно

Анализ ассоциаций между фенотипами гибридов F₂ и ДНК-маркерами.

Чувствительность к андростенону. Для того, чтобы учесть наблюдающуюся при анализе фенотипов разницу в чувствительности к андростенону между отдельными группами гибридов F₂, выделенными по полу, происхождению и распределению порогов чувствительности, анализ QTL был проведен как для всей

выборки гибридов F₂, так и по отдельности для самцов и самок с включением в анализ дополнительных ковариат. Результаты представлены в таблице 4, пример сканирования генома для всей выборки животных в модели с 1-м маркером, контролирующим признак, на рис. 5.

Рис. 5. По оси X – хромосомы, по оси Y – LOD оценка. Штриховая линия – пороги статистической достоверности. Верхняя – p<0.05, достоверные сцепления, нижняя – p<0.63, предположительные (1000 пермутаций). Ковариаты не включены.



Таблица 4. Анализ QTL. Чувствительность к андростенону F₂

Пиковый маркер	Хромосома	Позиция сМ, (ДИ – 1.5 LOD)	LOD оценка, р, ковариата	% фенотипической вариабельности
Все животные (n=119)				
rs3023694	2	54.7 (39-69)	2.11*	V 24.9%
rs3684371	12	10.6 (0-26)	2.4*	
rs3675244	17	61.6 (54-61.6)	2.37*	
Самцы (n=64)				
rs3684371	12	8.18 (1-20)	2.51*	V 59.4%
D5Mit78A	5	27.8 (16-43)	3.93* Пад	
rs3090959	11	16.7 (15-23)	4.67* Пинт	
rs3696932	9	49.9 (34-58)	2.58*ФПад	
D10Mit14	10	57.9 (53-62)	3.72**Фад	
D6Mit88	6	21.9 (19-36)	4.7*ФПинт	
rs3687598	9	46.4 (34-49)	5.07*ФПинт	
Самки (n=55)				
DXMit119	X	0 (0-22)	2.69*	V 63.2%
rs3675244	18	21.1 (27-44)	4.94*Кинт	
D6Mit259	6	63.9 (52-64)	2.71*КФад	
D1Mit362	1	93.5 (73-94)	7.05*КФинт	
D2Mit266	X	118	LODfull 11.73**	
rs3723498	X	25.3	LODint 10.1**Ф	

Примечания: Маркер1 X маркер2 – эпистатические взаимодействия, ДИ – доверительный интервал, * - p<0.63, ** - p<0.05, ковариаты – П, Ф, ПФ, К, КФ. адд – аддитивные, инт – интерактивные, П – «происхождение» (группы CN/NC+NC/NC и CN/CN + NC/CN), Ф –

«фенотипические группы» (для самцов группы – порог чувствительности к АНД <7 (1) и >7(2), для самок 3 – порог=0(1), 1-6(2), >7(3)), К – «кросс» (4 типа реципрокных гибридов F₂), ПФ – ковариата, вкл. взаимодействие между П и Ф, КФ – аналогично для К и Ф. LODfull – LOD оценка для полной модели при сканировании с 2 QTL, LODint=LODfull-LOD для аддитивной модели, V - отмечены эффекты, оставленные в иерархической модели с множественными QTL после пошагового исключения (исходно включены локусы и эпистатические вз-я p<0.63, взаимодействия с ковариатой П), обозначен % фенотипической вариабельности для этой модели (включает все помеченные «V» эффекты).

Межсамцовая агрессия. Результаты анализа QTL представлены в таблице 5, графическое отображение сканирования генома в модели с 1-м QTL на рис. 6.

Рис. 6. По оси X – хромосомы, по оси Y – LOD оценка. Штриховая линия – пороги статистической достоверности. Верхняя – p<0.05, достоверные сцепления, нижняя – p<0.63, предположительные (1000 пермутаций). Ковариаты не включены.



Таблица 5. Анализ QTL. Межсамцовая агрессия F₂.

Пиковый маркер	Хромосома	Позиция сМ, (ДИ – 1.5 LOD)	LOD-оценка	% фенотипической вариабельности
Латентный период первой атаки (ln)				
D8Mit205	8	21.4 (5-35)	2.83*	V
rs3655482 X	11	33.6	LODfull 12.9*	V 41%
D12Mit28	12	62.1	LODint 8.51** Пинт	
D9Mit206 X	9	14	LODfull 12.1*	V
D19Mit40	19	24.7	LODint 8.5** Пинт	
Максимальная интенсивность атак				
rs4227112	8	8.52 (0-36)	2.55*	V
D3Mit217	1	36.36 (0-53)	2.04*	V 21.5%
D3Mit230 X	3	38.7	LODfull 7.2*	
rs3090478	9	61.7	LODint 5.7**	V
Средняя интенсивность атак				
rs4227112	8	8.52 (0-30)	2.83*	V 17.1%

rs3693721	10	69.2 (58-82)	3.33*Пинт	V
Бинарная оценка агрессивности				
D8Mit205	8	21.4 (0-35)	2.2*	

Примечания: см. примечания к таблице 4

Поиск генов-кандидатов. Доверительные интервалы для локусов ($p < 0.63$), полученных при сканировании генома в модели с 1-м QTL (в том числе с включением ковариат) (падение оценки LOD в 1.5 раза относительно пика) были соотнесены с физическими позициями по базе данных NCBI build 37, линия C57Bl/6J, Ensembl. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>. Результаты поиска в определенных интервалах в PosMed по ключевым словам см. в таблицах 6 и 7.

Таблица 6. Поиск в PosMed. Чувствительность к андростенону.

Маркер	Границы области поиска, Mb (NCBI build 37)	Обонятельные рецепторы	Вомероназальные рецепторы	Кол-во найденных генов, поиск «olfaction»	5 лучших результатов, поиск «olfaction»
rs3023694	Хромосома 2 88.9-164.4 Mb	N=94	нет	n=145	<i>Prnp, Sdc4, Src, Plcb1, Tgm2</i>
rs3684371	Хромосома 12 11.1-72.9 Mb	нет	нет	n=46	<i>Odc1, Arf6, Srp54, Sstr1, Pik3cg</i>
rs3675244	Хромосома 17 81.4-95 Mb	нет	нет	n=15	<i>Lhcgr, Prkce, Fshr, Adcyap1, Msh2</i>
D5Mit78A	Хромосома 5 32.3-93.9 Mb	нет	нет	n=85	<i>Drd5, Csnb, Gnrhr, Gprk2l, Cxcl4</i>
rs3090959	Хромосома 11 23.4-51.3 Mb	N=24	нет	n=42	<i>Prop1, Adra1b, Gnb2l1, Dock2, Ltc4s</i>
rs3687598, rs3696932	Хромосома 9 41.5-110.7 Mb	нет	нет	n=159	<i>Drd2, Bace1, Cyp19a1, Rab27a, Rasgrf1</i>
D10Mit14	Хромосома 10 91.9-130 Mb	N=63	нет	n=71	<i>Lum, Dcn, Infng, Nts, Rap1b</i>
D6Mit188	Хромосома 6 57.1-105.8 Mb	нет	n=42(V1)	n=59	<i>Snca, Rab7, Trh, Rtnn, Spr</i>
DXMit119	Хромосома X 0-140.8 Mb	N=7	n=2(V2)	n=133	<i>Maob, Ar, Bgn, Syp, Gpc3</i>
rs3676196	Хромосома 18 42.0-66.0 Mb	нет	нет	n=32	<i>Adrb2, Sncaip, Ndst1, Htr4, Eif1a</i>
D6Mit259	Хромосома 6 123.6-150 Mb	нет	n=2(V2)	n=71	<i>Gnb3, Nras, Itpr2, lapp, Drpla</i>
D1Mit362	Хромосома 1 173.5-197 Mb	N=21	нет	n=43	<i>Psen2, Ncstn, Crp, Fcer1a, Apcs</i>

Примечание: «5 лучших результатов» - 5 верхних результатов из ранжированного списка (чем выше, тем меньше значение p согласно F-тесту), генерируемого в PosMed при поиске по ключевому слову.

Таблица 7. Поиск в PosMed. Параметры межсамцовой агрессии.

Показатель агрессивного поведения	Границы области поиска, Mb (NCBI build 37)	Количество найденных генов «aggressive behavior»	5 лучших результатов, «aggressive behavior»
Все исследованные	Хромосома 8 27.8-81.5 Mb	N=80	<i>Nr3c2, Nrg1, Casp3, Lpl, Adrb3</i>
Средняя интенсивность атак	Хромосома 10 112.6-130	N=55	<i>ErbB3, Tph2, Mdm2, Cdk2, Cdk4</i>
Максимальная интенсивность атак	Хромосома 1 12.8-106.8	N=155	<i>Htr2b, Des, Fn1, ErbB4, Casp8</i>

Примечание: см. к таблице 6

Участие дополнительной обонятельной системы в рецепции андростенона у доменной мыши

В этой серии экспериментов животные были предварительно сенсибилизированы

к андростенону в течение 2-х недель (0.1% андростенон, 16ч/день).

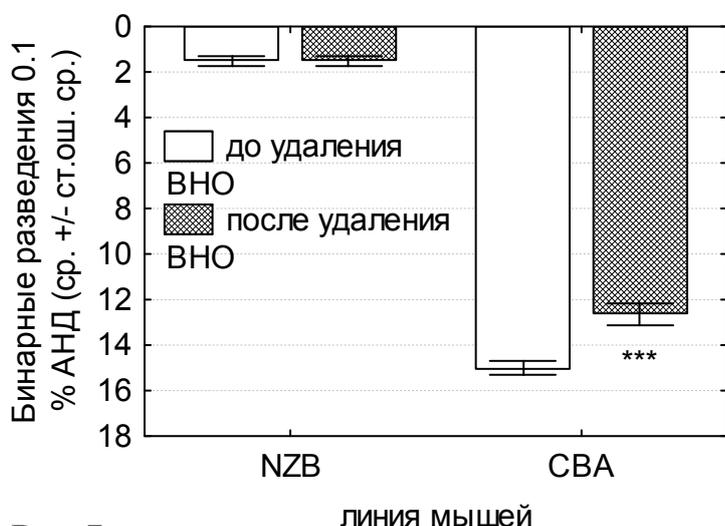


Рис. 7.

линия мышей

Удаление вомероназального органа. До удаления ВНО, пороги чувствительности к андростенону (см. рис. 7) составляли для мышей NZB/B1NJ (n=8) 0.05-0.025% (1-2 разведение), для мышей CBA/J (n=8) 5×10^{-5} - 3×10^{-6} % (11-15

разведение). После удаления ВНО у мышей линии CBA произошло достоверное падение чувствительности к андростенону в 2-16 раз (тест Вилкоксона для связанных выборок, $p < 0.001$). У мышей линии NZB пороги остались неизменными.

Исследование нейрональной активации в ВНО в ответ на стимуляцию андростеноном. Рецепторный эпителий вомероназального органа содержит две анатомически и функционально разделенные субпопуляции нейронов. Сенсорные нейроны в апикальной зоне, расположенной ближе к просвету органа, ко-

экспрессируют рецепторы семейства V1R и G-белок G_{i2} (Berghard and Buck, 1996, Dulac and Axel, 1995). Нейроны в базальной зоне вомероназального органа ко-экспрессируют рецепторы семейства V2R и G_o (Herrada and Dulac, 1997, Matsunami and Buck, 1997, Ryba and Tirindelli, 1997). Нейроны апикальной зоны активируются липофильными и высоколетучими соединениями мочи, а также одорантами основной обонятельной системы, тогда как нейроны в базальной зоне высокомолекулярными соединениями пептидной природы, обладающими феромональным действием (Krieger, et al., 1999).

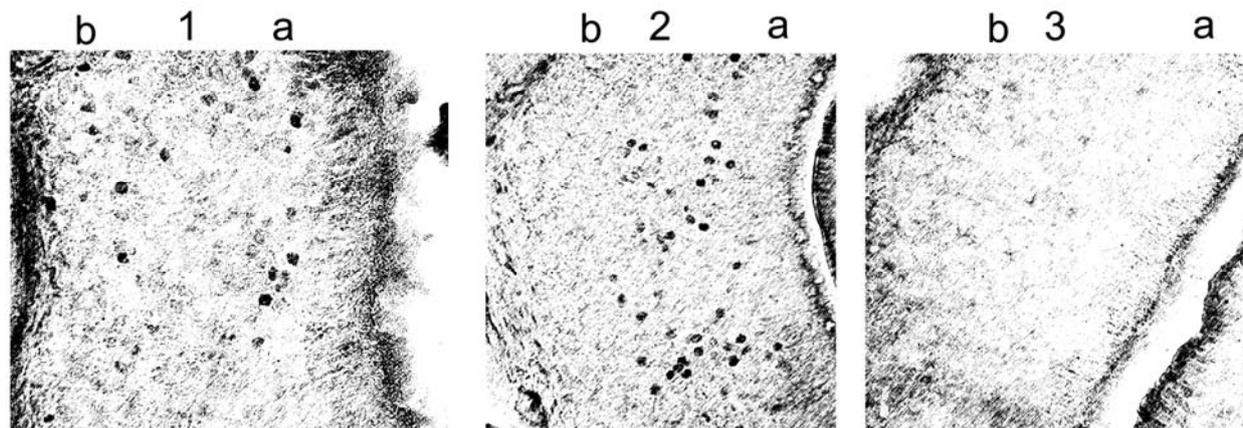


Рис. 8. Fos-иммунореактивность в рецепторной ткани ВНО. 1 - самец СВА, 2 – самец NZB, 3 – «контроль». а – апикальная часть, b – базальная часть. «Черные точки» - Fos-иммунореактивность

У высокочувствительных к андростенону самцов линии СВА/Лас (n=4) в наших опытах в ответ на предъявление 0.025% андростенона наблюдалась выраженная Fos-иммунореактивность в обеих зонах ВНО: апикальной и базальной, тогда как у низкочувствительных самцов NZB/B1NJ (n=4) – только в апикальной зоне, которая содержит рецепторы V1R (рис. 8). У контрольных животных обеих линий (n=4, n=4), которым предъявляли контрольный одорант - очищенное минеральное масло, Fos-иммунореактивности не наблюдалось.

Влияние андростенона на некоторые поведенческие и гормональные показатели у домово́й мыши

Тест на межсамцовую агрессию. В качестве резидентов в этом эксперименте использовали самцов гетерогенной лабораторной популяций (n=24). Самца-резидента ссаживали с кастрированным самцом-интродером (линии BALB/c) дважды. В одну из попыток («контроль») на аногенитальную область самца-интродера наносили пипеткой, втирая в шерсть, контрольный одорант (моча кастрированного самца BALB/c 10мкл + минеральное масло 5 мкл). Во время попытки «опыт» на интродера наносили 5 мкл 0.1% андростенона вместе с 10 мкл мочи кастрированного самца

BALB/c. Временной интервал между попытками был 24 часа. Мы наблюдали достоверные изменения только для времени обнюхивания резидентом кастрированного самца-интродера с нанесенным образцом андростенона (увеличение на 22%, $p < 0.05$). Отметим также тенденцию ($p = 0.07$) к увеличению латентного периода первой атаки (на 31%) в попытке «опыт».

Таблица 8. Показатели межсамцовой агрессии в 15 минутном тесте

Параметры поведения самцов-резидентов (n=24, ср. +/-ст. ош. ср.)	«Контроль»	«Опыт»-андростенон	Тест Вилкоксона, p
Латентный период 1-й атаки, с	363,9+/-80,4	526,3+/-85,6	p=0.07 н.д.
Время агрессивного поведения, с	6,2+/-2,1	7,8+/-2,6	p=1 н.д.
Оценка агрессивности, баллы	1,2	1	p=0.31 н.д.
Время обнюхивания интродера, с	128,0+/-13,8	163,4+/-20,0	p=0.04 *

Примечания: при расчете латентного периода 1-й атаки время для неатаковавших животных принято за 900с, «контроль» и «опыт» - см. пояснения в тексте, * - $p < 0.05$, н.д. – недостоверно.

Длительные экспозиции к андростенону. Мы исследовали влияние длительных 2-х недельных экспозиций к 0.025% андростенону (16 ч в сутки) на ориентировочно-исследовательскую активность в тесте «открытое поле» и предпочтение эстральной самки у мышей СВА/Лас. Первый тест проводили через 5 ч после окончания экспозиции, а второй на следующие сутки. Животных группы «опыт» (n=10) экспонировали к андростенону, группы «контроль» (n=10) к очищенному минеральному маслу (см. таблицу 9). Ни для одного из показателей теста «открытое поле» не было выявлено достоверных различий между группами после двухнедельной экспозиции к андростенону или к минеральному маслу. В тесте на предпочтение самцы СВА/Лас обеих экспериментальных групп предпочитали запах эстральной самки и имели близкие показатели как по времени исследования образца запаха эстральной самки, так и по времени исследования образца запаха самца.

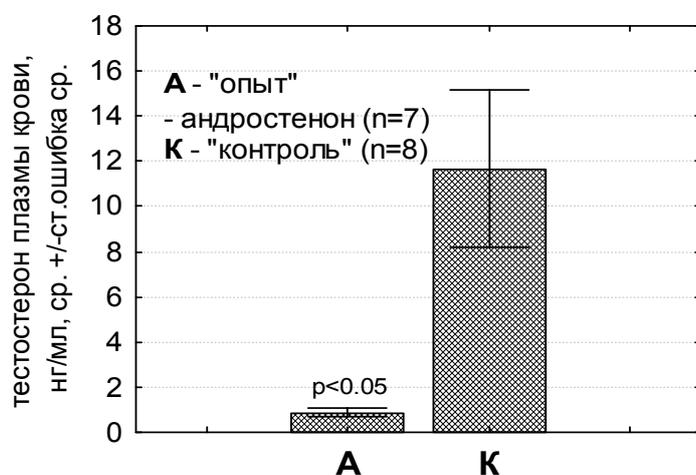
Таблица 9. Влияние 2-х недельных экспозиций АНД на поведение

Параметр (ср.+/ст.ошибка ср.)	«Контроль» N=10	«Опыт» N=10	T-тест, уровень p-
Тест «открытое поле»			
Число обследованных норок	14.7+/-1.3	14.4+/-1.4	0.88 н.д.
Время обнюхивания норок, с	9.1+/-0.9	10.3+/-1.1	0.42 н.д.
Число стоек	5.4+/-1.1	6.2+/-1.3	0.64 н.д.

Число дефекаций (по количеству болюсов)	4.6+/-0.6	5.9+/-0.3	0.09 н.д.
Кол-во грумингов	2.3+/-0.5	2.2+/-0.3	0.58 н.д.
Время груминга	6.2+/-1.2	5.1+/-1.2	0.33 н.д.
Тест на предпочтение запаха эстральной самки			
Параметр (ср.+/ст.ошибка ср.)	«Контроль» N=10	«Опыт» N=10	Тест Манна-Уитни, р-уровень
Время обнюхивания мочи эстральной самки (смесь от самок BALB/c), с	130.7+/-10.2	129.1+/-21.9	0.95 н.д.
Время обнюхивания мочи самца (смесь от самцов BALB/c), с	80.3+/-12.0	76.6+/-5.4	0.78 н.д.

Примечание: «контроль» и «опыт» - см. пояснения в тексте, н.д. - недостоверно

Содержание гормонов в плазме крови. Экспозиция к образцу, содержащему 5 мкл 0.1% андростенона в течение 30 минут в домашних клетках высокочувствительным к андростенону самцам СВА/Лас («опыт», n=7) вызывала достоверное (тест Манна-Уитни, $p < 0.05$) снижение концентрации тестостерона (Т) в плазме крови по сравнению с группой «контроль» (n=8, 5 мкл минерального масла +



10 мкл мочи самцов) (рис. 9). Содержание кортикостерона в тех же пробах у группы «опыт» составило 75.5 ± 18.7 нг/мл, а у группы «контроль» 78.3 ± 13.9 нг/мл (разница недостоверна). Время экспозиции было выбрано первоначально в соответствии с известной реакцией подъема уровня тестостерона в плазме крови у

Рис. 9.

самцов в ответ на предъявление запаха эстральной самки (Maguniak and Bronson, 1976). Заметим, что снижение Т наблюдалось на фоне относительно высокого содержания этого гормона в «контроле». В другом эксперименте, где также использовали самцов СВА/Лас, было отмечено пониженное содержание ($p < 0.001$, тест Манна-Уитни) Т в плазме крови («опыт2») в ответ на предъявление образца запаха эстральной самки (50 мкл мочи) в контексте запаха андростенона (5 мкл АНД + 25 мкл мочи кастр. самцов) по сравнению с «контролем 2» (5 мкл минерального масла и 50 мкл мочи эстральных самок). Концентрация Т в плазме крови в группе

«опыт 2» (n=8) составляла 2.64±0.56, а в группе «контроль 2» (n=8) 15.3±0.78 нг/мл. Таким образом, АНД способствовал снижению Т в двух независимых экспериментах.

Заключение

Была исследована информационная значимость молекулы андростенона в химической коммуникации домовый мыши с применением нескольких основных подходов. С одной стороны, мы использовали генетическую модель, основанную на инбредных линиях мышей СВА и NZB, контрастных по признакам чувствительности к андростенону и межсамцовой агрессии (Voznessenskaya et al, 1995). Отдельный интерес представляет участие различных отделов обонятельного анализатора в детекции андростенона у этих линий. С другой стороны, было изучено влияние андростенона на ряд поведенческих и физиологических показателей у домовый мыши.

На основе классического генетического скрещивания между линиями СВА/J и NZB/B1NJ был проведен анализ ассоциаций между фенотипами (чувствительностью к андростенону и показателями межсамцовой агрессии) и ДНК-маркерами (99 микросателлитных, 41 SNP), выявлены эпистатические взаимодействия между маркерами, оказывающие влияние на проявление признака. При анализе признака чувствительности к андростенону у всей выборки гибридов F2 (n=119) при простом сканировании генома в модели с одиночным QTL были выявлены предположительные ($p < 0.63$) локусы, контролирующие чувствительность к андростенону на 2 (rs3023694), 12(rs3684371) и 17(rs3675244) хромосомах. Эти 3 локуса аддитивно объясняют 25% фенотипической вариабельности. При анализе, выполненном для отдельных групп животных с включением ковариат, помимо ряда предположительных локусов (см. таблицу 4), был обнаружен достоверный ($p < 0.05$) локус на 10 хромосоме (D10Mit14) у самцов, объясняющий распределение порогов внутри групп малочувствительных и высокочувствительных животных, а также достоверное эпистатическое взаимодействие между маркерами на 2 хромосоме (D2Mit266) и X хромосоме (rs3723498) у самок (LODfull $p < 0.05$, LODint $p < 0.05$).

Анализ расщепления по чувствительности к АНД во втором поколении, а также разница порогов между самцами, но не самками реципрокных кроссов в F1 указывают на возможное сцепление признака с X-хромосомой. Однако мы не обнаружили локусов на X хромосоме (исследовано 3 маркера) в полной мере определяющих данный признак. Таким образом, наши данные указывают на сложный характер наследования признака под влиянием нескольких генетических локусов (см. таблицу 4). Суперсемейство генов обонятельных рецепторов млекопитающих одно из самых обширных в геноме (Buck and Axel, 1991). Одним из вероятных объяснений

аномии представляется существование специфических вариантов генов обонятельных рецепторов. Поиск в областях найденных нами при сканировании генома локусов обнаружил обонятельные рецепторы на 2, 11, 10, 1 и X хромосомах. Обонятельные рецепторы в геноме мыши расположены кластерами (Zhang and Firestein, 2002), что не позволяет соотнести полученные нами сцепления с отдельными генами. Также в областях предположительных локусов на 6 и X хромосомах локализованы гены вомероназальных рецепторов.

Имеется довольно много литературных источников, связывающих активность отдельных генов млекопитающих с агрессивным поведением (например, обзор Maxson and Canastar, 2003). Однако, работ в которых бы использовались преимущества QTL-анализа и сканирование всего генома не так много (всего 2), причем использовались отличные от наших методы оценки агрессивного поведения и другие инбредные линии. Обнаруженные в нашем исследовании предположительные ($p < 0.63$) локусы на 8 хромосоме (D8Mit205, rs4227112) и на 10 хромосоме (rs3693721) подтверждают значимость ранее описанных QTL, соответственно Imab2 на 8 хромосоме (D8Mit8, Roubertoux et al, 2005) и Aggr1 на 10 хромосоме (D10Mit267, D10Mit103, Brodtkin et al, 2002).

Мы наблюдали сочетание сниженной способности распознавать андростенон и повышенной агрессивности у самцов NZB, а также у гибридов первого поколения NC (мать NZB). При сравнении поведения самцов родительских линий по отношению к запахам самца и эстральной самки, было обнаружено отсутствие предпочтения у малочувствительных к андростенону самцов NZB. Сочетание хемодефицита к летучим стероидам (на примере андростенона) с атипичной межсамцовой агрессией и отсутствием предпочтения запаха эстральной самки у самцов NZB свидетельствует в пользу гипотезы о связи специфического хемодефицита с отклонениями в социальном и репродуктивном поведении. В F_2 корреляции между фенотипическими показателями агрессивного поведения и чувствительностью к андростенону не было обнаружено. Однако, при отсутствии корреляции фенотипов в F_2 нельзя сделать однозначного вывода о том, что эти 2 признака находятся под влиянием разных генов (Crusio, 2006). Так, в нашем исследовании доверительные интервалы для одного из локусов, контролирующего чувствительность к андростенону на 10 хромосоме и локуса, контролирующего агрессивное поведение значительно пересекались, что говорит о возможном сцеплении между генами, контролирующими признаки или о плейотропном действии гена.

Обонятельная система у большинства млекопитающих представлена двумя анатомически и функционально разделенными отделами – основной (ООС) и

дополнительной обонятельной системами (ДОС). Последняя, по всей видимости, сформировалась в эволюционном плане как специализированная система для анализа веществ типа феромонов. Участие структур основной обонятельной системы в рецепции андростенона было подтверждено в работах на различных видах млекопитающих (Dorries, et al., 1997, Keller, et al., 2007, Wang, et al., 1993). В нашей группе был показан (по Fos-иммунореактивности) специфический паттерн активации гломерул в ответ на предъявление андростенона в медиовентральной части основной обонятельной луковицы у высокочувствительных мышей линии СВА. У мышей линии NZB такого паттерна активации не было выявлено; наблюдали только отдельные Fos-позитивные клетки (Voznessenskaya, Wysocki, 2002). В данном исследовании хирургическое удаление вомероназального органа достоверно снижало пороги детекции андростенона у высокочувствительных мышей СВА, однако мыши на уровне поведения все равно оставались чувствительными к андростенону. Для изначально малочувствительных мышей NZB мы не наблюдали изменения порогов в этом эксперименте. Таким образом, в детекции андростенона у домового мыши принимает участие, как основная обонятельная система, так и дополнительная. Особый интерес представляют полученные на качественном уровне данные об активации нейронов в различных зонах ВНО у мышей линий СВА и NZB. Детекция андростенона нейронами вомероназального органа, в том числе и нейронами базальной зоны, участвующими в трансдукции феромональных сигналов (Krieger et al, 1997), указывает на возможную роль андростенона или его структурных аналогов в феромональной регуляции у домового мыши. В недавних работах Холи (Holy) и соотр. также было показано, что ряд сульфатированных стероидов, в том числе андростенового ряда, вызывает ответ на уровне вомероназального эпителия (Nodari, et al., 2008). Заметим, что при поиске генов-кандидатов в области локусов (см. таблицы 6 и 7), согласно нашим данным влияющим на чувствительность к андростенону, были обнаружены гены как рецепторов основной обонятельной системы, так и вомероназальной (V1R и V2R).

Мы исследовали возможные эффекты андростенона на поведение и уровень гормонов у домового мыши. Согласно единичным литературным данным о возможной феромональной роли андростенона у домового мыши, этот одорант, предъявленный в контексте мочи кастрированного самца, индуцирует агрессию у мышей линии SJL (Ingersoll, Launay, 1986). Совокупность тенденций, полученных в наших экспериментах на мышах гетерогенной лабораторной популяции (снижение доли агрессивных животных, увеличение латентного периода первой атаки), скорее, напротив, свидетельствует о снижении уровня агрессии по отношению к

кастрированным самцам с нанесенным на аногенитальную область раствором андростенона (0.1%). Полученные нами данные не соответствуют в полной мере эффекту, описанному Ингерсолом.

Однако наши данные находятся в хорошем соответствии с остальными результатами исследований по влиянию андростенона на уровень основных стероидных гормонов в плазме крови. Полуторная экспозиция к 0.1% андростенону вызывала достоверное ($p < 0.05$) падение тестостерона в плазме крови у высокочувствительных к этому одоранту самцов мышей (линии СВА). Тестостерону отводится ведущая роль в регуляции агрессивного поведения у домашней мыши (Veeman, 1947, Edwards, 1968, 1969). Таким образом, быстрая реакция - падение тестостерона в ответ на предъявление андростенона может послужить объяснением наблюдаемой тенденции к снижению агрессивного поведения. Уровень кортикостерона – основного биохимического показателя стрессированности животных, измеренный в тех же пробах, оставался неизменен. Отсутствие стрессирования андростеноном подтверждают и данные поведенческих экспериментов, проведенных после длительной, двухнедельной экспозиции к этому одоранту высокочувствительных мышей СВА. Андростенон не оказал достоверного влияния на ориентировочно-исследовательскую активность животных в условиях открытого поля и исследование образцов мочи эстральных самок и самцов в тесте на предпочтение. Совокупность полученных данных: достоверный гормональный ответ на экспозицию андростенона, тенденция к снижению агрессивного поведения под влиянием андростенона, а также вовлечение вомероназального органа в детекцию этого одоранта, свидетельствует о возможной хемосигнальной роли андростенона в регуляции агрессивного поведения у домашней мыши.

ВЫВОДЫ

1. С использованием модели специфической аносмии к андростенону описан полигенный характер наследования обонятельной чувствительности к летучим стероидам у домашней мыши. Впервые выявлены предположительные локусы, контролирующие чувствительность к андростенону на 2-ой (rs3023694), 12-ой (rs3684371) и 17-ой (rs3675244) хромосомах, аддитивно объясняющие 25% фенотипической вариабельности. На основе результатов анализа QTL, проведенного по отдельности для самцов и самок предложены модели, объясняющие, соответственно 59% и 63% фенотипической вариабельности. В областях обнаруженных локусов был проведен поиск генов-кандидатов.

2. Впервые с использованием модели специфической аносмии к андростенону для показателей агрессивного поведения выявлены предположительные локусы на 8-

ой (D8Mit205, rs4227112), 10-ой (rs3693721) и 1-ой (D3Mit217) хромосомах, а также описан ряд эпистатических взаимодействий. Доверительные интервалы для достоверного локуса на 10-ой хромосоме, частично объясняющего чувствительность к андростенону, и предположительного локуса, выявленного для показателей агрессивности на той же хромосоме, перекрываются. Для каждого из показателей агрессивного поведения была предложена модель, одновременно описывающая найденные генетические эффекты. В областях обнаруженных локусов был проведен поиск генов-кандидатов.

3. На модели специфической аносмии к андростенону продемонстрировано отсутствие предпочтения запаха эстральной самки у самцов мышей с хемодифицитом к летучим стероидам.

4. Показано, что как основная, так и дополнительная обонятельная система участвуют в детекции андростенона у домового мыши. У мышей с хемодифицитом к летучим стероидам на уровне рецепторной ткани вомероназального органа наблюдали отличия по характеру Fos-иммунореактивности.

5. Предъявление андростенона (0.1%, 30 мин) вызывало достоверное ($p < 0.05$) снижение уровня тестостерона в плазме крови у мышей с низким порогом обонятельной чувствительности к летучим стероидам. При этом уровень кортикостерона для тех же животных оставался неизменным, что свидетельствует о специфическом характере влияния андростенона.

6. Совокупность полученных данных: достоверный гормональный ответ на экспозицию андростенона, тенденция к снижению агрессивного поведения под влиянием андростенона, а также вовлечение вомероназального органа в детекцию этого одоранта, свидетельствует об информационной значимости летучих стероидов как хемосигналов в регуляции агрессивного поведения у домового мыши.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

А) статьи в рецензируемых журналах списка ВАК

1. Вознесенская В.В., Ключникова М.А. Роль основной и дополнительной обонятельной системы в детекции феромона млекопитающих андростенона у домового мыши. // Сенсорные системы, том 23, № 1, Январь-Март 2009, С. 67-71

Б) другие статьи

2. Ключникова М.А., Вознесенская В.В. Специфическая аносмия к феромону млекопитающих андростенону и агрессивность у инбредных линий мышей. // Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых. Материалы Конференции молодых сотрудников и аспирантов Института проблем

экологии и эволюции им. А.Н. Северцова 10–11 апреля 2008 г., КМК, М., 2008. С. 172-179

3. Ключникова М.А., Вознесенская В.В. Роль вомероназального органа в восприятии феромона млекопитающих андростенона у домашней мыши. // Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых. Материалы конференции молодых сотрудников и аспирантов Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН 5-6 октября 2006 г., КМК., М., 2006. С. 124-129
4. Вознесенская А.Е., Ключникова М.А., Вознесенская В.В. Влияние запаха хищника на материнское поведение у грызунов.// Научные труды МПГУ, М., Прометей, 2006. С. 374-377

В) тезисы конференций

5. Klyuchnikova M.A., Voznessenskaya V.V. Sensitivity to Androstenone and Aggressive Behavior in Inbred Strains of Mice // *Chemical Senses*, 2009, V.34(3), E.34
6. Voznessenskaya V.V., Klyuchnikova M.A. The Role of Main Olfactory System and Vomeronasal Organ in Induced Sensitivity to Androstenone// *Chemical Senses*, 2009, V.34(3), E-32-33
7. Klyuchnikova M.A., Wysocki C.J., Voznessenskaya V.V. The Role of Vomeronasal organ in Reception of Sex boar Pheromone Androstenone// *Chemical Senses*, 2007, 32(6), A. 44-45
8. M.A.Klyuchnikova & Vera V.Voznessenskaya. The Role of Vomeronasal Organ in Reception of Androstenone in Inbred Strains of Mice.// *Chemical Senses*, 2006, V. 31(8), E50-51
9. Klyuchnikova M., Wysocki C., Voznessenskaya V. The role of vomeronasal organ in reception of androstenone in mice.//*Hystrix, The Italian Journal of Mammalogy*, 2007, V.1 (Suppl., V European Congress of Mammalogy, Siena, Italy, September, 2007), pp105
10. MA Klyuchnikova, CJ Wysocki, VV Voznessenskaya. The role of main and accessory olfactory system in sensitivity to androstenone in inbred strains of mice.// *Abstracts of Chemical Signals in Vertebrates XI* (Chester, UK, July 25-28, 2006). P. 23
11. Ключникова М.А., Вознесенская В.В. Специфическая anosmia к стероидам (на примере андростенона) и агрессивность у домашней мыши. // *Биология – наука XXI века. 11-я Международная Пушчинская школа-конференция молодых ученых. Сборник тезисов, 29 октября – 2 ноября 2007 года*, С.251-252
12. Ключникова М.А. Роль дополнительной обонятельной системы в рецепции андростенона у домашней мыши. // *IV Всероссийская конференция по поведению животных 29 октября - 1 ноября 2007 года. Сборник тезисов, Москва, 2007*, С. 70

Ключникова Мария Александровна

**Роль летучих стероидов (на примере андростенона) в регуляции
агрессивного поведения у домашней мыши.**

Химические сигналы принимают участие в регуляции социального поведения млекопитающих. В работе была исследована сигнальная роль молекулы андростенона в регуляции агрессивного поведения у домашней мыши. Мы использовали генетическую модель специфической anosмии к андростенону и межсамцовой агрессии, созданную на основе инбредных линий лабораторных мышей NZB/B1NJ и CBA/J. Методом картирования локусов количественных признаков были идентифицированы локусы, а также выявлены эпистатические взаимодействия между ДНК-маркерами, контролирующими признаки обонятельной чувствительности к андростенону и межсамцовой агрессии. Иммуногистохимическими методами показана Fos-иммунореактивность в ответ на стимуляцию андростеноном на уровне рецепторной ткани вомероназального органа. Также было исследовано влияние андростенона на поведение и уровень основных стероидных гормонов плазмы крови. Предъявление андростенона вызывало достоверное снижение уровня тестостерона у мышей. Совокупность полученных данных указывает на возможную роль андростенона в химической коммуникации домашней мыши.

Klyuchnikova Maria Alexandrovna

**The role of volatile steroids (case study of androstenone) in
regulation of aggressive behavior in house mouse.**

Chemical signals are involved in regulation of social behaviour in mammalian species. Signal role of androstenone molecule in aggressive behavior was investigated. We used a genetic model of specific androstenone anosmia and elevated intermale aggression based on NZB/B1NJ and CBA/J inbred strains of laboratory mice. Using a classical F2 intercross design, we interbred mice from NZB/B1NJ and CBA/J strains, conducted a full genome scan using DNA-markers and assessed the presence of QTLs and epistatic interactions, which effect androstenone sensitivity and intermale aggression phenotypes. Androstenone exposures induced Fos-immunoreactivity in receptor tissue of vomeronasal organ. Hormonal and behavioral responses to androstenone exposures were studied. Androstenone significantly reduced plasma testosterone level in mice. The data obtained indicate that androstenone may play role in chemical communication in mice.