

ЗАВИСИМОСТЬ ОТНОШЕНИЯ ДЛИН ВТОРОГО И ЧЕТВЕРТОГО ПАЛЬЦЕВ (2D:4D) ОТ УСЛОВИЙ ПРЕНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ У ВОДЯНОЙ ПОЛЕВКИ (*ARVICOLA AMPHIBIUS* L.)

© 2020 г. Г. Г. Назарова^{a, *}, Л. П. Проскурняк^a, Е. И. Южик^{a, b, **}

^aИнститут систематики и экологии животных СО РАН, ул. Фрунзе, 11, Новосибирск, 630091 Россия

^bИнститут молекулярной патологии и патоморфологии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины, ул. Тимакова, 2, Новосибирск, 630117 Россия

*e-mail: galinanazarova@mail.ru

**e-mail: infuturo@mail.ru

Поступила в редакцию 12.03.2019 г.

После доработки 25.09.2019 г.

Принята к публикации 30.09.2019 г.

Отношение длин второго и четвертого пальцев (2D:4D) используется как маркер пренатальной андрогенизации. Подобное отношение длин пальцев 2D:4D обнаружено у человека и многих видов животных. Морфологические маркеры пренатальных воздействий важны в популяционных исследованиях. Нами проведено измерение пальцевого индекса 2D:4D у самцов и самок водяной полевки (*Arvicola amphibius* L.). Проведен анализ зависимости этого показателя от пола и морфофизиологических характеристик матери (масса тела после родов, уровень тестостерона в период беременности). Обнаружено сходство между однопометниками по величине пальцевого индекса. Выяснено, что на индекс 2D:4D достоверно влияют андрогенный статус матери в период беременности и масса тела матери после родов. Сделан вывод о возможности использовать пальцевой индекс 2D:4D в эколого-популяционных исследованиях как маркер пренатальных гормонально-обусловленных материнских эффектов.

Ключевые слова: водяная полевка, *Arvicola amphibius*, материнский эффект, пальцевой индекс 2D:4D, тестостерон, беременность

DOI: 10.31857/S047514502001005X

ВВЕДЕНИЕ

Изучение морфометрических показателей андрогенизации важно для понимания источников вариативности морфологических, поведенческих и репродуктивных качеств животных, предупреждения патологических состояний (Jeevanandam, Muthu, 2016). Пальцевой индекс, или отношение длин второго и четвертого пальцев (2D:4D), был изначально предложен психологом Д.Т. Мэннингом как оригинальный морфометрический показатель кисти руки человека (Manning et al., 1998) и широко используется в антропологии как маркер пренатальной андрогенизации (Бутовская и др., 2015). Морфогенез пальцев, по-видимому, имеет консервативную природу и подобное отношение длин пальцев 2D:4D обнаружено у многих животных разных видов (Хайруллин и др., 2013). Одни и те же семейства Нох-генов у людей и мышей вовлечены в андроген-зависимое развитие гениталий и морфогенез пальцев (Reichel et al., 1997). Однако, существуют противоречивые данные относительно половых различий по пальцевому ин-

дексу у приматов (Nelson, Shulz, 2010) и грызунов (Yan et al., 2009; Brown et al., 2002a; Auger et al., 2013). У разных видов индекс 2D:4D выше у самцов или у самок, или же половые отличия по индексу 2D:4D отсутствуют (Хайруллин и др., 2013).

Поскольку большинство половых различий у млекопитающих возникают под воздействием андрогенов (Breedlove et al., 1998) и пальцевой индекс 2D:4D существенно не меняется после пубертации (Manning et al., 1998; Zheng, Cohn, 2011), то длина пальцев может определяться пренатальным уровнем тестостерона. Это предположение подтверждает наличие маскулинизированного индекса 2D:4D у людей с врожденной гиперплазией коры надпочечников (Brown et al., 2002b). Тестостерон во многих исследованиях также связан с асимметричным развитием. Кортикальная и гиппокампальная асимметрия чаще встречается у самцов и более выражена с правой стороны (Tan, Kutlu, 1993; Wisniewski, 1998; Tabibnia et al., 1999). И половой диморфизм по пальцевому индексу 2D:4D наиболее выражен на правой конечности как у людей

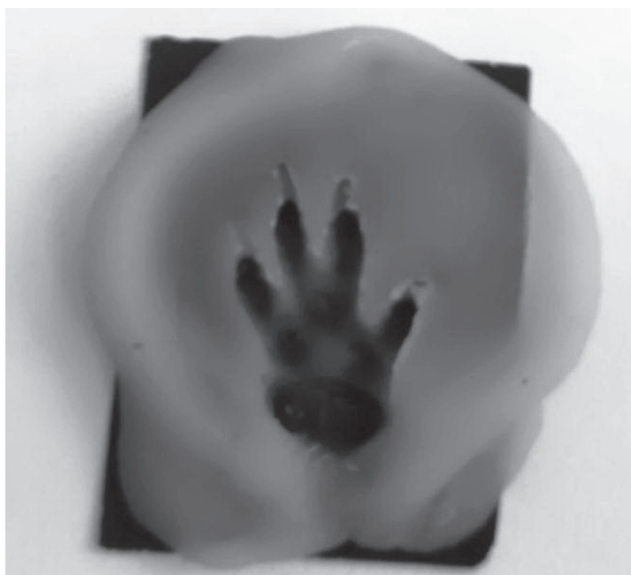


Рис. 1. Отпечаток правой кисти для измерения длин пальцев.

(Manning et al., 1998), так и у мышей (Brown et al., 2002a).

Пальцевой индекс 2D:4D также может отражать пренатальный эффект эстрогенов (Lutchmaya et al., 2004). Экспериментальные работы на крысах (Talarovicova et al., 2009; Auger et al., 2013) и мышах (Zheng, Cohn, 2011) подтвердили, что пальцевой индекс 2D:4D контролируется балансом андрогенов и эстрогенов, взаимодействующих с соответствующими рецепторами в короткий промежуток эмбриогенеза. У мышей половой диморфизм по индексу 2D:4D проявляется с 17 дня эмбрионального развития (Zheng, Cohn, 2011). Ксеноэстрогены *in vitro* и *in utero* влияют на развитие скелета у самцов, приводя к феминизации индекса 2D:4D (Auger et al., 2013).

У водяной полевки (*Arvicola amphibius* L.) содержание тестостерона в крови самок повышается в период беременности (Южик и др., 2013). Известно также, что на андрогензависимые признаки самцов влияют физические кондиции матери во время беременности (Назарова, Евсиков, 2010). Индекс 2D:4D у водяной полевки ранее не оценивался. Неизвестны взаимоотношения между физическими кондициями беременных самок и выработкой у них половых гормонов, а также взаимосвязь физических кондиций матери с пальцевым индексом 2D:4D.

Цель работы — оценить пальцевой индекс 2D:4D у самцов и самок водяной полевки и найти зависимость этого показателя от пола и морфофизиологических характеристик матери (масса тела после родов, уровень тестостерона в период беременности).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Условия содержания и разведения

Работа выполнена на животных лабораторной колонии вивария Института систематики и экологии животных СО РАН, основателями которых были особи, отловленные в 1984 г. в районе проведения многолетнего эколого-генетического мониторинга циклирующей популяции водяной полевки (д. Лисьи Норки Убинского района Новосибирской области). Группа этих животных поддерживается контролируемым размножением и регулярным, через каждые 1–3 года, пополнением особями из природных популяций для ограничения инбридинга. Животных содержали в индивидуальных клетках (25 × 25 × 48 см) при естественном фотопериоде, температуре 18–25°C, свободном доступе к воде и корму (зерновая смесь, морковь, проростки овса, пшеницы).

В работе использованы детеныши из 11 помётов разных матерей 1–2 летнего возраста, всего 19 самцов и 24 самки. Из них до возраста 1 год дожили 33 животных (16 самок и 17 самцов). Оценку пальцевого индекса проводили в возрасте 10 недель и повторно, через 1 год.

Измерение длины пальцев

Измерения длин пальцев проводили на отпечатках кисти правой передней конечности по методике Gooderham et al., 2012. Для получения отпечатков использовали пластилин Play-Doh™ (23845; Hasbro). Из пластилина изготавливали диски диаметром 15 мм, толщиной 1 мм и прикрепляли их на листы картона. Отпечаток получали, прижимая кисть к диску, распределяя физические усилия равномерно по всем пальцам. Для каждого животного было сделано по 2–3 отпечатка. Измерения проводили в течение 10–15 мин после получения отпечатков под микроскопом МБИ-10 с помощью электронного штангенциркуля (точность измерения 0.01 мм). Длину пальцев измеряли от головки дистальной фаланги до основания проксимальной фаланги (рис. 1). На каждом отпечатке измерение длин пальцев повторяли три раза для точности, затем рассчитывали среднее. Пальцевой индекс рассчитывали как отношение длин второго и четвертого пальцев.

Измерение уровня тестостерона

Уровень тестостерона в крови матерей определяли на 17–19 день беременности. Кровь брали из ретроорбитального синуса. Из крови выделяли сыворотку, затем ее хранили в пластиковых микропробирках при –20°C до определения в ней концентрации гормона. Определение концентрации тестостерона в сыворотке крови осуществляли с помощью набора реагентов для иммунофермент-

Таблица 1. Оценка эффектов факторов раннего развития на пальцевый индекс D2:D4 у водяной полевки (результаты GLM)

Эффекты	df	Лог-правдоподобие	χ^2	P
Свободный член	1	42.46		
Тестостерон матери	1	52.46	19.99	<0.001
Размер помета	1	53.51	2.11	0.15
Соотношение полов	1	53.52	0.02	0.90
Масса тела матери	1	56.0	4.98	0.03
Идентификационный номер помета	6	62.68	13.35	0.04

ного анализа (ЗАО “Вектор-Бест”, г. Новосибирск). Чувствительность набора 0.2 нмоль/л, коэффициент вариации не превышает 8%. Концентрацию определяли по калибровочной кривой после измерения оптической плотности раствора с образцами сыворотки при основной длине волны 450 нм и референтной длине волны 620 нм.

Статистическая обработка

Статистическую обработку проводили с помощью программы “Statistica 6.1”. Для оценки влияния пола использовали однофакторный дисперсионный анализ. Влияние факторов пренатального развития на отношение длин пальцев в возрасте 10 нед. устанавливали с помощью множественного регрессионного анализа, применяя обобщенную линейную модель I типа (GLM). В качестве факториальной переменной использовали идентификационный номер помета, непрерывных предикторных — массу тела матери после родов, содержание тестостерона в ее крови, величину помета при рождении и долю самцов среди новорожденных. Функция связи — логарифм. Для оценки сходства пальцевого индекса в разном возрасте — 10 недель и одного года, а также выяснения долговременных эффектов на этот признак андрогенного статуса матери использовали корреляционный анализ.

В тексте и таблицах приведены средние значения признаков (X), стандартная ошибка ($\pm$ SE) и объем выборок (n). Уровень статистической значимости принят $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Средние значения индекса 2D:4D у самцов (1.003 ± 0.020) и самок (0.998 ± 0.020) соответствуют диапазону значений индекса 2D:4D у других видов (Хайруллин и др., 2013). Статистический анализ данных показал, что влияние пола на отношение длин пальцев не достоверно ($F_{1,41} = 0.03$, $p = 0.86$), и далее его не учитывали. Установлено, что на пальцевый индекс достоверно влияют только идентификационный номер помета, ан-

дрогенный статус матери и масса тела матери после родов (табл. 1).

Для всей популяции потомков обнаружена отрицательная корреляция пальцевого индекса 2D:4D с уровнем тестостерона в крови матери в период беременности ($r = -0.61$, $p < 0.001$) и положительная с массой тела матери после родов ($r = 0.39$, $p = 0.01$), рис. 2. Корреляция тестостерона матери с ее массой тела недостоверна: $r = 0.35$, $p = 0.29$.

Выявлена достоверная корреляция между пальцевым индексом особей в возрасте 10 недель и одного года ($r = 0.40$, $p < 0.05$) и установлена связь отношения длин второго и четвертого пальцев во взрослом состоянии с содержанием тестостерона в крови матери в период беременности ($r = -0.45$, $p < 0.01$).

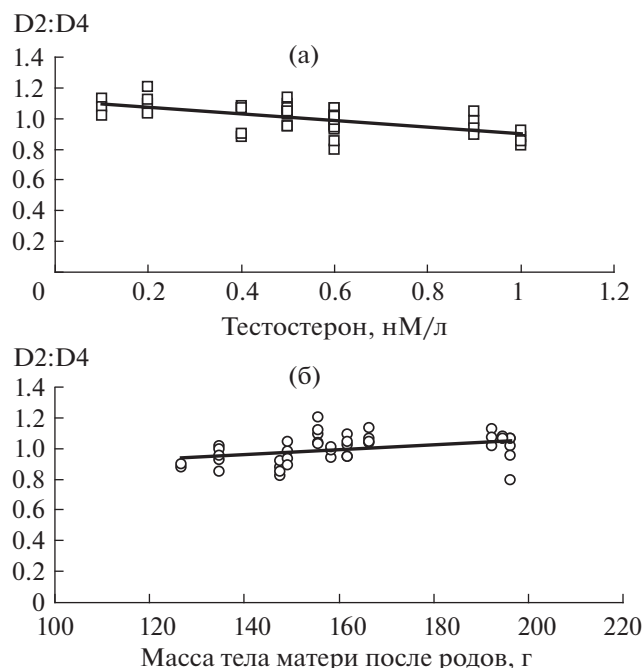


Рис. 2. Корреляция между пальцевым индексом D2:D4 и (а) содержанием тестостерона в крови матери на 17–19 день беременности; (б) массой тела матери после родов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты измерений пальцевого индекса 2D:4D у водяной полевки показали отсутствие полового диморфизма по этому показателю, что соответствует сведениям, полученным на инбредных мышах (Bailey et al., 2005), красной белке (Gooderham et al., 2012) и пашенной полевке (Lilley et al., 2010). Отсутствие полового диморфизма принято связывать с внутриутробной циркуляцией тестостерона между эмбрионами разного пола у многоплодных млекопитающих (Bailey et al., 2005).

По пальцевому индексу обнаружено сходство между особями одного помета и выяснено, что этот показатель зависит от гормонального статуса и физического состояния матери. Полученный результат согласуется с выводами других авторов о значительном вкладе генетических факторов в дисперсию отношения длин второго и четвертого пальцев. У людей влияние генотипа составляет 50–66% (Paul et al., 2006; Voracek et al., 2009).

Тестостерон во время беременности синтезируется фетоплацентарным комплексом, яичниками матери, надпочечниками и жировой тканью (Saanen et al., 2016). Ранее мы выяснили, что у водяной полевки в период беременности содержание тестостерона в крови повышается пропорционально числу живых эмбрионов, что указывает на его значимую роль в поддержании беременности (Южик и др., 2013, 2015). С величиной помета у водяной полевки положительно связано аногенитальное расстояние (Назарова, Евсиков, 2010), андрогензависимый признак (Dean, Sharpe, 2013).

В данном исследовании установлена отрицательная корреляция между уровнем тестостерона в крови матери на поздней стадии беременности и индексом 2D:4D потомства в возрасте 10 недель и одного года, что согласуется со сведениями об андрогензависимом развитии скелета конечностей и соответствует подобным корреляциям, найденным у людей и других видов животных (Manning et al., 1998; Zheng, Cohn, 2011). В исследованиях на молекулярном уровне, выполненных другими авторами, установлено, что пренатальный тестостерон связан с экспрессией генов *HOXA* и *HOD A*. Гены *HOXA* высоко консервативны у млекопитающих и вовлечены в процесс дифференцировки пальцев. Они также участвуют в определении пола, морфогенезе мочеполовой системы, фертильности и кроветворении (Zhang et al., 2013).

У водяной полевки обнаружена положительная связь между физическим состоянием матери, оцениваемом по массе тела после родов, с индексом D2:D4. Корреляция между массой тела матери и содержанием тестостерона в крови оказалась статистически незначима. Вероятно, другие гормоны, кроме тестостерона, опосредуют влияние физического состояния матери на морфометри-

ческие характеристики пальцев. Например, у пашенной полевки (*Microtus agrestis* (L., 1761)) пальцевой индекс положительно коррелирует с содержанием кортикостерона в крови матери перед зачатием (Lilley et al., 2010). На людях и птицах показано, что феминизация пальцевого индекса вызывается повышенным содержанием эстрадиола (Robinson et al., 2000; Saino et al., 2007).

Андрогенный статус матери оказывает программирующее влияние не только на морфологическое развитие, но и на иммунитет и поведение взрослого потомства. Например, у пашенной полевки с увеличением пальцевого индекса D2:D4 возрастает риск заражения эндопаразитами (Navarro et al., 2007; Lilley et al., 2010).

Обобщая собственные результаты и сведения литературы, можно сделать вывод, что пальцевой индекс может быть использован в эколого-популяционных исследованиях как удобный маркер пренатальных гормонально-обусловленных материнских эффектов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят рецензентов за ценные замечания и пожелания по доработке рукописи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена по Программе ФНИ государственных академий наук на 2013–2020 гг. (проект № VI.51.1.8).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Г.Г. Назарова — планирование эксперимента, взятие отпечатков и измерение длин пальцев, статистическая обработка данных, участие в написании текста статьи; Л.П. Проскурняк — разведение животных; Е.И. Южик — взятие крови, определение уровня тестостерона, участие в написании текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бутовская М.Л., Буркова В.Н., Феденко Ю.Н. Пальцевой индекс как индикатор пренатальной андрогенизации и его связь с морфометрическими и пове-

- денческими характеристиками у человека // Этнографическое обозрение. 2015. № 2. С. 99–116.
- Назарова Г.Г., Евсиков В.И. Физическое состояние матери в период беременности и половое созревание потомков-сыновей водяной полевки *Arvicola terrestris* // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. 2010. Т. 46. № 2. С. 143–147.
- Хайруллин Р.М., Филиппова Е.Н., Бутков А.А. и др. Линейные зависимости значений пальцевого (2D:4D) индекса у лиц мужского пола // Вестник Московского университета. Серия 23. Антропология. 2011. № 2. С. 16–24.
- Хайруллин Р.М., Фомина А.В., Айнуллова Н.К. Вариабельность значений 2D:4D пальцевого индекса у диких и лабораторных животных // Фундаментальные исследования. 2013. № 6. С. 611–618.
- Южик Е.И., Проскурняк Л.П., Назарова Г.Г. Динамика морфофизиологических показателей самок водяной полевки (*Arvicola amphibious* L.) в период беременности // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. 2013. Т. 49. № 4. С. 290–295.
- Южик Е.И., Проскурняк Л.П., Назарова Г.Г. Корреляции репродуктивных показателей самок водяной полевки (*Arvicola amphibious*) с морфометрическими и гормональными характеристиками // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. 2015. Т. 51. № 2. С. 122–126.
- Auger J., Le Denmat D., Berges R. et al. Environmental levels of oestrogenic and antiandrogenic compounds feminize digit ratios in male rats and their unexposed male progeny // Proc. R. Soc. B. 2013. V. 280. № 1768. P. 20131532.
- Bailey A.A., Wahlsten D., Hurd P.L. Digit ratio (2D:4D) and behavioral differences between inbred mouse strains // Genes Brain Behav. 2005. V. 4. P. 318–323.
- Breedlove S.M., Cooke B.M., Jordan C.L. The orthodox view of sexual differentiation of the brain // Brain Behav. Evol. 1998. V. 54. P. 8–14.
- Brown W.M., Finn C.J., Breedlove S.M. Sexual dimorphism in digit-length ratios of laboratory mice // Anat. Rec. 2002a. V. 267. № 3. P. 231–234.
- Brown W.M., Hines M., Fane B. et al. Masculinized finger length patterns in human males and females with congenital adrenal hyperplasia // Horm. Behav. 2002b. V. 42. № 4. P. 380–386.
- Caanen M.R., Kuijper E.A., Hompes P.G. et al. Mass spectrometry methods measured androgen and estrogen concentrations during pregnancy and in newborns of mothers with polycystic ovary syndrome // Eur. J. Endocrinol. 2016. V. 174. P. 25–32.
- Dean A., Sharpe R.M. Clinical review: Anogenital distance or digit length ratio as measures of fetal androgen exposure: relationship to male reproductive development and its disorders // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2013. V. 98. № 6. P. 2230–2238.
- Jeevanandam S., Muthu P.K. 2D:4D ratio and its implications in medicine // J. Clin. Diagnos. Res. 2016. V. 10. № 12. P. CM01–CM03.
- Gooderham K.L., Schulte-Hostedde A.I. Does 2D:4D predict fitness in a wild mammal? // Can. J. Zool. 2012. V. 90. P. 93–100.
- Lutchmaya S., Baron-Cohen S., Raggatt P. et al. 2nd to 4th digit ratios, fetal testosterone and estradiol // Early Human Development. 2002. V. 77. P. 23–28.
- Lilley T., Laaksonen T., Huitu O., Helle S. Maternal corticosterone but not testosterone level is associated with the ratio of second-to-fourth digit length (2D:4D) in field vole offspring (*Microtus agrestis*) // Physiol. Behav. 2010. V. 99. P. 433–437.
- Manning J.T., Scott D., Wilson J. et al. The ratio of 2nd to 4th digit length: a predictor of sperm numbers and concentrations of testosterone, luteinizing hormone and oestrogen // Hum. Reprod. 1998. V. 13. P. 3000–3004.
- Mills S.C., Grapputo A., Jokinen I. et al. Testosterone-mediated effects on fitness-related phenotypic traits and fitness // Am. Nat. 2009. V. 173. № 4. P. 475–487.
- Navarro C., Lope F.D., Moller A.P. Digit ratios (2D:4D), secondary sexual characters and cell-mediated immunity in house sparrows *Passer domesticus* // Behav. Ecol. 2007. V. 18. № 8. P. 1161–1168.
- Nelson E., Shultz S. Finger length ratios (2D:4D) in anthropoids implicate reduced prenatal androgens in social bonding // Am. J. Phys. Anthropol. 2010. V. 141. P. 395–405.
- Peichel C.L., Prabhakaran B., Voght T.F. The mouse *Ulnaless* mutation deregulates posterior *HoxD* gene expression and alters appendicular patterning // Development. 1997. V. 124. P. 3481–3492.
- Robinson S.J., Manning J.T. Ratio of 2nd to 4th digit length and male homosexuality // Evol. Hum. Behav. 2000. V. 21. № 5. P. 333–345.
- Saino N., Rubolini D., Romano M., Boncoraglio G. Increased egg estradiol concentration feminizes digit ratios of male pheasants (*Phasianus colchicus*) // Naturwissenschaften. 2007. V. 94. № 3. P. 207–212.
- Tabibnia G., Cooke B.M., Breedlove S.M. Sex difference and laterality in the volume of the mouse dentate gyrus granule cell layer // Brain Res. 1999. V. 827. P. 41–45.
- Tan U., Kullu N. Relationships among weights of right and left cerebral hemispheres and right minus left brain weight in right- and left-pawed male and female cats: importance of body weight // Int. J. Neurosci. 1993. V. 69. P. 53–66.
- Voracek M., Dressler S.G. Brief communication: Familial resemblance in digit ratio (2D:4D) // Am. J. Phys. Anthropol. 2009. V. 140. № 2. P. 376–380.
- Paul S.N., Kato B.S., Cherkas L.F., Andrew T., Spector T. Heritability of the second to fourth digit ratio (2D:4D): a twin study // Twin Res. Hum. Gen. 2006. V. 9. № 2. P. 215–219.
- Wisniewski A.B. Sexually-dimorphic patterns of cortical asymmetry, and the role for sex steroid hormones in determining cortical patterns of lateralization // Psychoneuroendocrinology. 1998. V. 23. P. 519–547.
- Yan R.H.Y., Bunning M., Wahlsten D. et al. Digit ratio (2D:4D) differences between 20 strains of inbred mice // PLoS One. 2009. V. 4. № 6. P. 5801.
- Zhang C., Dang J., Pei L., et al. Relationship of 2D:4D finger ratio with androgen receptor CAG and GGN repeat polymorphism // Am. J. Hum. Biol. 2013. V. 25. № 1. P. 101–106.
- Zheng Z., Cohn M.J. Developmental basis of sexually dimorphic digit ratios // PNAS USA. 2011. V. 108. № 39. P. 16289–16294.

Dependence of the Ratio of the Lengths of the Second and Fourth Fingers (2D:4D) on the Conditions of Prenatal Development in a Water Vole (*Arvicola amphibius* L.)

G. G. Nazarova^{1, *}, L. P. Proskurnyak¹, and E. I. Yuzhik^{1, 2, **}

¹*Institute of Systematics and Ecology of Animals of the Siberian Branch of the RAS, Biological Sciences, ISEA SB RAS, ul. Frunze 11, Novosibirsk, 630091 Russia*

²*Institute of Molecular Pathology and Pathomorphology – Subdivision of FRC FTM, ul. Timakova 2, Novosibirsk, 630117 Russia*

*e-mail: galinanazarova@mail.ru

**e-mail: infuturo@mail.ru

Received March 12, 2019; revised September 25, 2019; accepted September 30, 2019

The ratio of the lengths of the second and fourth fingers (2D:4D) is used as a marker of prenatal androgenization. A similar ratio of finger lengths 2D:4D was found in humans and many animal species. Morphological markers of prenatal effects are important in population studies. We measured the digital index 2D:4D in males and females of a water vole (*Arvicola amphibius* L.). The analysis of the dependence of this indicator on gender and the morphophysiological characteristics of the mother (body weight after parturition, testosterone level during pregnancy) is carried out. A similarity was found between littermates in terms of finger index. It was found out that the androgen status of the mother during pregnancy and the body weight of the mother after childbirth reliably affect the 2D:4D index. The conclusion is made about the possibility of using the 2D:4D finger index in environmental population studies as a marker of prenatal hormone-related maternal effects.

Keywords: water vole, *Arvicola amphibius*, maternal effect, finger index 2D:4D, testosterone, pregnancy