

*На правах рукописи*

ХОЦКИНА АННА СТАНИСЛАВОВНА

**Влияние иммунизации, полового опыта и  
репродуктивного успеха самцов мышей на  
химический состав и сигнальные свойства их  
мочи**

1.5.5. Физиология человека и животных

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Институт Цитологии и генетики Сибирского отделения российской академии наук» (г. Новосибирск.)

**Научный  
руководитель:**

**Завьялов Евгений Леонидович**, кандидат биологических наук, заведующий ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН (г.Новосибирск)

**Официальные  
оппоненты:**

**Котенкова Елена Владимировна**, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН» (г.Москва)

**Карпенко Марина Николаевна**, доктор биологических наук, доцент, заведующая лабораторией нейрехимии ФГБНУ «Институт Экспериментальной Медицины» (г.Санкт-Петербург)

**Ведущая  
организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук (г.Санкт-Петербург)

Защита диссертации состоится «17» апреля 2025г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета 35.2.025.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный аграрный университет», 630039, г. Новосибирск, ул. Добролюбова 160.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке университета и на сайте ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет» <https://edubiotech.ru/>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 г

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Князев Сергей Павлович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Половой отбор рассматривается в качестве одного из ведущих факторов эволюционного развития (Fisher, 1958; Kokko et al., 2003; Dougherty, 2020). В условиях постоянной конкуренции сформировались специализированные способы привлечения особей противоположного пола, а также критерии оценки качества полового партнера на основе исходящих от него сигналов. В привлекательность особи вносит существенный вклад ее иммунный статус, питание, иерархический статус, а также набор генов и их совместимость с генотипом партнера (Yamazaki et al., 1976; Lenington, 1983; Egid, Brown, 1989; Potts et al., 1991; Penn, 2002; Zala et al., 2004; Thom et al., 2008; Герлинская и др., 2012; Koyama, 2016).

Свободный выбор, основанный на сигналах от партнера, как правило, обеспечивает рождение наиболее жизнеспособного потомства. Так, в опытах на разных видах животных было показано, что адаптивные свойства потомства существенно выше у особей, рожденных в парах со свободным поведенческим выбором партнера по сравнению с потомками, родители которых не имели возможности выбора (Drickamer et al., 2000; Gowaty et al., 2007; Nelson et al., 2014; Raveh et al., 2014).

У большинства видов грызунов в качестве важнейшего сигнального фактора выступает запах (Penn, Potts, 1998). Было показано, что животные способны по запаху различать генотип конспецификов, их социальный статус и функциональное состояние иммунной системы (Yamazaki et al., 1976; Lenington, 1983; Egid, Brown, 1989; Potts et al., 1991; Potts et al., 1994; Hurst, Beynon, 2004; Beauchamp, Yamazaki, 2003; Герлинская и др., 2012; Zala et al., 2015; Thoß et al., 2019). Изучение компонентного состава ольфакторных сигналов грызунов с использованием разных инструментальных анализов (газовая и жидкостная хроматография, масс-спектрометрия) выявили более 1000 различных компонентов мочи грызунов (Miyashita, Robinson, 1980; Schwende et al., 1986; Röck et al., 2007; Schaefer et al., 2010; Liu et al., 2017). В том числе были найдены компоненты, которые отвечают за привлекательность для противоположного пола (Novotny et al., 2007). Были установлены некоторые физиологические реакции реципиентов при восприятии феромонов, такие, например, как ускорение полового созревания и сокращение эстрального цикла самок, срыв беременности, развитие молочных желез (Bruce, Parrott, 1960; Jemiolo et al., 1985; Novotny et al., 1999b; Lin et al., 2005; Koyama et al., 2015). Однако до сих пор нет работ, где были бы найдены химические маркеры, отражающие качество полового партнера и являющиеся основанием для его выбора.

## **Целью исследования**

было изучить химический состав и сигнальные свойства мочи самцов мышей в зависимости от их репродуктивного успеха и при разных функциональных состояниях.

### **Задачи:**

1. изучить компонентный состав мочи и ее привлекательность для самок у самцов двух генетических линий: C57BL/6 и BALB/c;
2. исследовать влияние полового опыта самцов на особенности состава их мочи и ее привлекательности для самок;
3. установить химический состав мочи самцов и ее привлекательность для самок после активации иммунной системы;
4. определить химические особенности мочи и ее привлекательность для самок у самцов в зависимости от их репродуктивного успеха.

### **Научная новизна**

Исследование химического состава образцов мочи самцов и их ольфакторных предпочтений самками впервые проведено на инбредных мышах. Впервые было показано, что:

1. Химический состав мочи, определяющий ее запах, имеет индивидуальные особенности даже у инбредных животных;
2. Взаимодействие самцов с самками сопровождается снижением уровня некоторых детектируемых соединений в моче;
3. Активация иммунной системы приводит к существенному изменению компонентного состава мочи самцов линии BALB/c, но не C57BL/6;
4. Хроматографический анализ образцов мочи позволяет дискриминировать самцов по фертильности покрытий, имеющих в помете разное количество эмбрионов, их массу и массу их плацент;
5. Самки на основании ольфакторных стимулов способны выявлять самцов с фертильными покрытиями.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Полученные данные вносят вклад в решение фундаментальной проблемы определения механизмов полового отбора. Показана сигнальная значимость целого ряда ранее не изученных соединений мочи, что дает основания для дальнейшего развития метабомики репродуктивных характеристик отдельных особей.

Перспективы изучения механизмов, лежащих в основе полового отбора открывают возможности для управляемого повышения рождаемости у человека, целевого изменения процессов воспроизводства в животноводстве, а также сохранении животных в неволе, а также сохранении редких и охраняемых видов. Результаты исследования могут быть использованы для повышения эффективности разведения животных в питомниках, включая разведение лабораторных животных.

Промышленное разведение некоторых сельскохозяйственных видов уже столкнулось с вырождением потомства и ослабеванием репродуктивной функции. Данное исследование может стать основой для разработки одного из путей инструментального подбора пар при разведении животных.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Композиция летучих соединений мочи самцов может служить маркером их генетических особенностей, иммунного статуса, полового опыта и репродуктивного успеха;
2. Интактные самки линий BALB/c и C57BL предпочитают запах мочи самцов с меньшим числом потомков.

### **Личный вклад соискателя**

Все тестирования *in vivo*, забор образцов мочи, статистическая обработка данных, а также интерпретация результатов проведены автором самостоятельно. Репродуктивные характеристики самцов были оценены совместно с д.б.н. Л.А. Герлинской и С.О. Масленниковой. Работа на хроматографе Agilent и масс-спектрометрия были проведены совместно с к.х.н. Ю.В. Патрушевым.

### **Апробация работы**

По материалам диссертации опубликовано 5 работ, из них 2 статьи в рецензируемом отечественном журнале (WOS), 3 тезисов на всероссийских (2) и международной (1) конференциях.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация включает введение, обзор литературы, разделы, описывающие материалы и методы исследований, результаты, обсуждение результатов, выводы, заключение, список сокращений и список цитируемой литературы. Работа изложена на 142 страницах, содержит 39 рисунков и 14 таблиц. Библиографический указатель включает 257 источников литературы.

### **Благодарности**

Автор благодарит коллег за помощь в сборе и обработке материала: д.б.н. Л.А. Герлинскую, д.б.н. М.П. Мошкина, к.б.н. Д.В. Петровского, к.б.н. Г.В. Концевую, С.В. Масленникову, к.х.н. Ю.В. Патрушеву, к.б.н. А.В. Ромашенко, к.б.н. Е.П. Шнайдер и О.Б. Шевелева. Особую благодарность Автор выражает Центру коллективного пользования «Центр генетических ресурсов лабораторных животных», сформированного на базе ЦКП SPF-виварий ИЦиГ СО РАН за предоставление SPF-животных и доступ к оборудованию. Автор благодарит научного руководителя Завьялова Е.Л. за помощь и поддержку на всех этапах работы.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Экспериментальные животные и экспериментальные группы**

Исследования выполнены на базе ЦКП SPF-виварий ИЦиГ СО РАН. Самцы и самки линий мышей BALB/c и C57BL/6 были в возрасте 8-10 недель на момент начала исследования. Животных содержали в индивидуально вентилируемых клетках (OptiMice, Animal Care, USA) группами по 2-5 особей до начала экспериментов, при свободном доступе к воде и гранулированному корму для мышей («Чара», Павлов-Посад), искусственном фотопериоде 14C:10T, температуре 22–24°C и влажности 30–70%. В качестве подстилочного материала использовали березовые гранулы (ООО «Альбион», Новосибирск). Корм и подстилочный материал поступали к животным после стерилизации автоклавированием при 121 °C. Воду очищали при помощи фильтрационной системы Millipore. На протяжении всего эксперимента для поддержания устойчивых эстральных циклов (Colby, Vandenberg, 1974) в клетки самок ежедневно добавляли подстилку из клеток самцов соответствующей линии.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям межинститутской биоэтической комиссией Института Цитологии и Генетики СО РАН, протокол 8 от 19.03.2012.

### **Схема эксперимента**

52 самца линий BALB/c и 52 самца линии C57BL/6 (разведение ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН, полученных из Jackson Laboratory) рассаживали по одному за три дня до начала эксперимента. В нулевой день эксперимента самцы были произвольно разделены на контрольную и антиген-стимулированную группы. Контрольным животным была сделана внутрибрюшинная инъекция 0,9% изотонического раствора NaCl 100 мкл на мыш. Антиген-симулированные животные получили внутрибрюшинную инъекцию гемоцианина (Sigma), разведённого в 100 мкл физиологического раствора в дозе 0,2мг/кг. На третий день эксперимента самцы были ссажены с самками для проверки репродуктивных качеств исследуемых самцов (к каждому самцу подсаживали двух интактных самок той же линии). На 9 день эксперимента (через 6 дней содержания с самками) проводили эвтаназию и некропсию самцов.

### **Оценка параметров размножения**

По две интактные самки подсаживали к каждому самцу на 3 сутки после иммунизации (или введения физраствора) самцов. Покрытие определяли по наличию пробки ежедневно с 7 часов после начала светлой фазы. Покрытых самок сразу же отсаживали от самца (день отсадки

считали 0 днем беременности) и содержали одиночно до 16 суток беременности, затем проводили эвтаназию и некропсию. Подсчитывали число плодов, плоды и их плаценты взвешивали. Далее в анализе данных эти признаки использовались как категориальные с разбивкой по медиане.

### **Сбор мочи**

Мочу у самцов собирали на 0, 3, 9 сутки, а также после каждого обнаружения пробки у подсаженных к нему самок – с 4 по 9 сутки эксперимента. Таким образом, моча на 0 и 3 сутки была собрана у самцов, содержавшихся изолированно, с 4 по 9 сутки – у самцов, содержавшихся с самками. Пробы собирали на чашку Петри, сразу же переносили в пробирки Eppendorf, замораживали и хранили при температуре -80°C в течение 4-6 недель до последующих исследований.

### **Ольфакторный тест**

Через 4-6 недель после сбора мочи у самцов, интактные половозрелые самки были использованы для проведения ольфакторного тестирования. Тестирование проводили в двух вариантах – с предъявлением одного (одиночный тест) или двух образцов мочи одновременно (парный тест). Всего в тестировании было задействовано – 107 самок BALB/c и 115 самок C57BL/6.

За сутки до эксперимента самок рассаживали по индивидуальным клеткам, в которых и проводили тестирование при красном освещении, сразу после выключения света. За час до эксперимента тестируемую мочу самцов размораживали при комнатной температуре, наносили на фильтровальную бумагу размером 5 мм × 30 мм по 20 мкл и помещали в усеченный на 5 мм наконечник для автоматической пипетки объемом 1 мл. Большое отверстие закрывали ватным тампоном. Такая конструкция исключала возможность прямого контакта самки с образцом, что гарантировало исследование только летучих соединений. Самки исследовали мочу самцов только своей линией.

Стимулы помещали в углах домашней клетки животного, на расстоянии по 5 см от ближайших сторон клетки. Тестирование проводили в течение 10 минут, результаты записывали на видеокамеру. Каждую пару стимулов (или один стимул в случае одиночного тестирования) предъявляли трем разным самкам для увеличения надежности получаемых статистических данных. Обработку видеозаписей проводили с использованием компьютерной программы, разработанной в Лаборатории экологической генетики млекопитающих ИЦиГ СО РАН (автор Д.В. Петровский). Программа производит автоматическую обработку нажатий на клавиши оператором, что позволяет определить время первого подхода к стимулу (латентное время), общее количество подходов и длительность обнюхивания.

Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA показал отсутствие значимого влияния фактора стадии эстрального цикла на поведение самок в ольфакторном тестировании. Тем не менее, для последующего анализа эффектов стимула на поведение самки проводили центрирование первичных данных отдельно внутри каждой группы в зависимости от предъявляемого стимула (контрольные самцы, антигенстимулированные самцы и самцы, содержащиеся с самками).

### **Газовая хроматография и масс спектрометрия**

Хроматографирование проводили на газовом хроматографе Agilent 7890A GC с колонкой HP-5MS длиной 30 м, диаметром 0.25 мм, толщиной пленки НЖФ 0.25 мм. В качестве детектора использовали масс-спектрометр Agilent 7000 Series Triple Quadrupole GC/MS. Полученные масс-спектры веществ сопоставляли с базой данных NIST08 программой библиотечного поиска MassHunter. Исследовали 54 пробы мочи самцов и 8 проб воздуха в помещении.

### **Статистическая обработка данных**

Статистический анализ полученных данных был выполнен с использованием пакета STATISTICA 6.0. Соответствие нормальному распределению устанавливали по критерию Колмогорова-Смирнова. Анализ данных хроматографического исследования образцов мочи проводили с использованием критерия Манна-Уитни. Для обработки данных ольфакторного тестирования (распределение всех признаков соответствовало нормальному) использовали анализ повторяющихся образцов Repeated Measure ANOVA, с факторами «генотип», «тип тестирования» (одиночный или парный ольфакторный тест) и исследуемый фактор. Для выявления отличий между парами групп использовали LSD-тест). Для интегральной характеристики паттернов летучих соединений использовали метод PLS DA (дискриминантного анализа частичных наименьших квадратов) с последующим сравнением осей при помощи двухфакторного дисперсионного анализа.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Анализ полученных хроматограмм и масс-спектров**

Индивидуальные хроматограммы мочи intactных самцов насчитывали от 34 до 55 пиков. В общей сложности удалось зафиксировать 81 уникальный пик. Из дальнейших расчетов были исключены соединения, площадь пиков которых в моче обеих исследуемых линий, статистически значимо не превышала таковые в пробах воздуха. Таким образом было выделено 34 пика.

Масс-спектрометрический анализ проводили для всех пиков в каждой из исследованных проб. Среди детектированных соединений, были также обнаружены два феромона самцов мышей: 2-втор-бутил-4,5-дигидротиазол



(SBT) и экзобревикомин. Вещества, составляющие 32 пика из 34 выбранных для анализа, были полностью идентифицированы.

#### **Межлинейные различия в составе мочи и реакции самок на ее запах**

Среди исследуемых 34 пиков не наблюдалось уникальных ни для одной из линий. Однако были выявлены количественные различия по 6-ти из 34 анализируемых соединений, содержание которых значительно различается между исследуемыми линиями. Оказалось, что только содержание ацетофенона было выше у самцов линии BALB/c ( $Z=-2,45$ ;  $p=0,014$ ), тогда как содержание 2-бутоксигексанола ( $Z=2,45$ ;  $p=0,014$ ), 1-(2-этоксипропокси)-пропан-2-ола ( $Z=2,45$ ;  $p=0,014$ ) и трех изомеров 1-[2-(2-метокси-1-метилэтоксигексанола)-1-метилэтоксигексанола] ( $p=0,025$ ,  $p=0,025$  и  $p=0,043$ ) у самцов линии C57BL/6 превышало значения, обнаруженные у самцов линии BALB/c.

При проведении ольфакторных тестов было выявлено, что мыши исследуемых линий проявляют разную активность по отношению к запаху образцов мочи от интактных самцов. Независимо от типа тестирования, самки линии BALB/c проявляли значительно большую активность, чем самки линии C57BL/6 при исследовании запаховых стимулов самцов своих линий, что выражалось в большем количестве подходов к стимулу ( $p<0,001$ ) и более длительному общему времени обнюхивания ( $p<0,001$ ). Латентное время обнюхивания стимулов не различалось между линиями. При этом тип тестирования (с одним или двумя образцами) оказывал значимое влияние только на поведение самок линии BALB/c ( $p<0,001$ ).

#### **Влияние полового опыта самца**

##### **на состав его мочи и реакцию самок на ее запах**

При подсадке самок в моче самцов обеих исследуемых линий площади пиков целого ряда веществ уменьшилась: 22-х в образцах мочи самцов BALB/c и 5 – в образцах мочи самцов C57BL/6. При этом у самцов C57BL/6 число детектированных пиков (соединений) уменьшилось на 5, а у BALB/c на 4. Содержание самцов с доступом к самкам и их запаху в работе ДеКатанзаро привело к снижению креатинина и некоторых продуктов метаболизма стероидных гормонов в моче самцов (deCatanzaro et al., 2009), что было расценено автором как разбавление мочи вследствие повышенного потребления воды. В соответствии с этой гипотезой, вещества, содержание которых уменьшается, могут рассматриваться как продукты метаболизма, не несущие сигнальной функции. В таком случае обращают на себя внимание вещества, площадь пиков которых не снижается, или даже возрастает. Так у самцов линии BALB/c, содержащихся с самками, в моче не наблюдалось снижения для 12 соединений: 6-этил-7-гидроксигексанола-3-она, этилбензола, ксилитола, 3-гептен-2-она, экзобревикомина, ацетофенона, о-толуидина,  $\alpha,\alpha$ -диметил

бензолметанола, SBT, 1-окса-4,5-дитиопана, N-фенил-формамида и бензотиазола. Причем площади пиков 2-х из них: ацетофенона и SBT – одного из феромонов самцов мышей, значимо возросли. У самцов C57BL/6 таких соединений оказалось значительно больше: содержание 29 веществ из 34 не снизилось.

Исследование ольфакторной привлекательности запаха выявило, что самки обеих линий могли различать опытных и наивных самцов только при парном сравнении. При этом самки C57BL/6 предпочитали хемосигналы опытных самцов (рис.1А), тогда как самки BALB/c больше времени обнюхивали мочу наивных самцов (рис.1Б). Латентное время не различалось между исследуемыми группами.

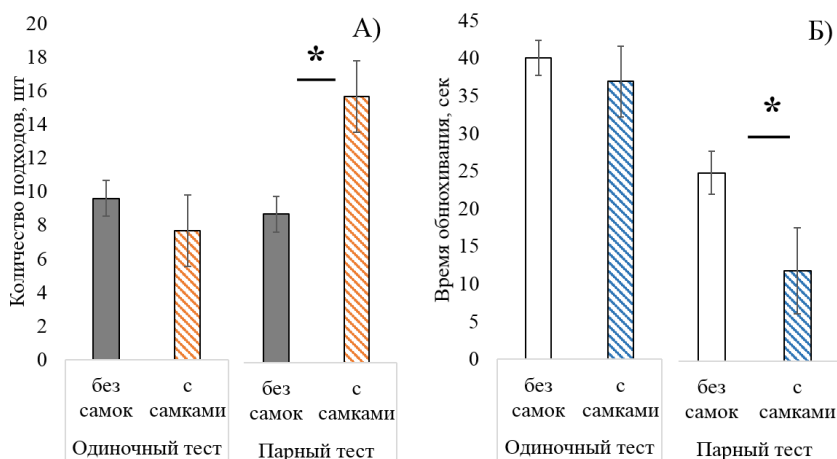


Рис.1. А - Количество подходов к образцам мочи самцов линии C57BL/6 в зависимости от их сексуального опыта. Б – Время обнюхивания образцов мочи самцов самками линии BALB/c в зависимости от их сексуального опыта. \*\* -  $p < 0,01$  LSD-test.

Таким образом, моча сексуально опытных самцов линии C57BL/6, в которой при подсадке самок снижалось содержание только 15% летучих компонентов, привлекала самок больше, чем моча интактных самцов. В то время как моча самцов BALB/c, в которой при подсадке самок снижалось содержание 65% компонентов, привлекала интактных самок меньше, чем моча контрольных самцов.

### Влияние иммунизации самцов на изменение состава их мочи и реакцию самок на ее запах

Заражение животных субклиническими дозами нереплицируемых антигенов влечет за собой изменение поведения конспецификов по отношению к иммунизированным особям (Moshkin et al., 2001; Zala et al., 2004; Akulov et al., 2009; Zala et al., 2015). Эксперименты с предъявлением только запаховых меток антигенстимулированного животного позволяют сделать вывод об изменении хемосигналов при активации иммунной системы (Moshkin et al., 2001; Litvinova et al., 2005; Герлинская и др., 2012). При использовании гемоцианина данные эффекты наблюдаются на третьи сутки после иммунизации (Герлинская и др., 2012). Для оценки эффектов иммунизации на профиль летучих веществ мочи самцов было проведено сравнение площади пиков в моче интактных самцов и на 3 сутки после введения гемоцианина (KLH). Было обнаружено значимое увеличение бензотиазола в моче иммунизированных животных (с  $1029 \pm 201$  до  $1309 \pm 298$ ,  $Z = -2,23$ ,  $n = 10$ ,  $p = 0,026$ ) (рис. 2А).

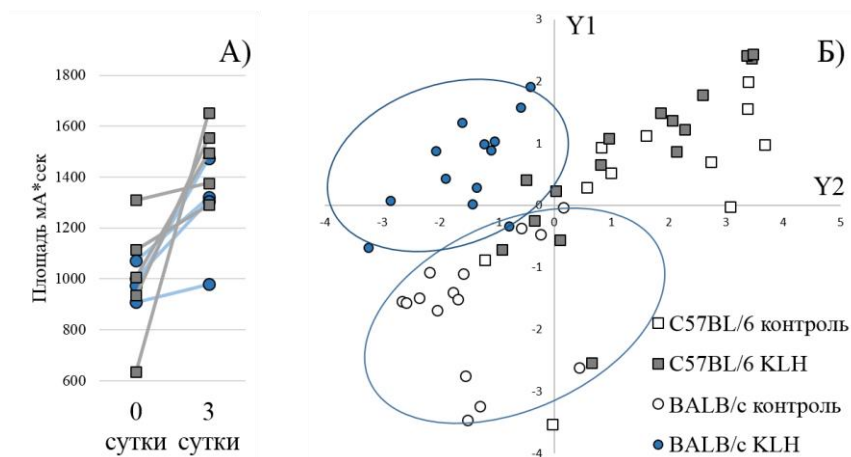


Рис.2. А - Индивидуальные графики траектории изменения площади пиков веществ в моче на третьи сутки после иммунизации. Серым цветом отмечены самцы линии C57BL/6, синим – самцы BALB/c. Б - Распределение индивидуальных паттернов ЛОС в пространстве осей Y1 и Y2 (PLS DA) у контрольных и иммунизированных самцов мышей линии C57BL/6 и BALB/c с различными условиями содержания.

Анализ распределения индивидуальных значений паттернов летучих органических соединений (ЛОС) в многомерном пространстве осей Y1 и

Y2 PLS DA показал отдельные облака, образованные образцами мочи контрольных и иммунизированных самцов линии BALB/c (рис.2Б) Двухфакторный дисперсионный анализ подтвердил значимое влияние генотипа и иммунизации на средние значения координат Y1 и Y2. При проведении post-hoc анализа (LSD-тест) были выявлены достоверные отличия только у самцов линии BALB/c ( $p < 0,001$ ), но не для самцов C57Bl/6 ( $p = 0,348$ ).

На 3 сутки после иммунизации запах мочи антигенстимулированных животных оказался менее привлекательным, чем запах контрольных, что выражалось в меньшем времени обнюхивания стимула самками линии BALB/c и только в парном тестировании ( $p = 0,035$ ) (рис.3). Важно, что при отсутствии альтернативы самки уделяли равное количество времени обнюхиванию стимулов от контрольных и иммунизированных самцов, а в условиях выбора дискриминировали эти образцы.

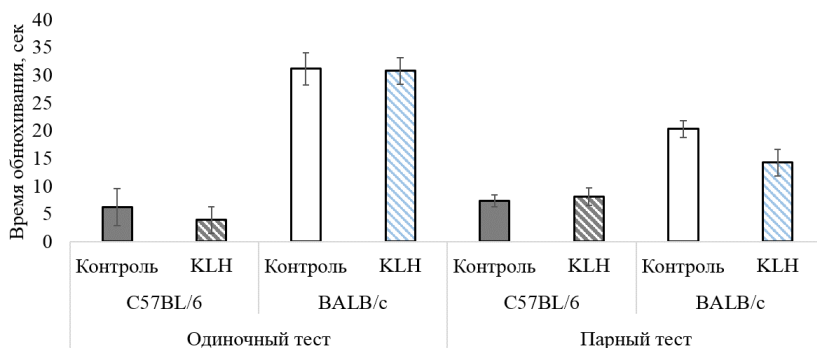


Рис.3. Время обнюхивания образцов мочи самцов в зависимости от их иммунного статуса. \* -  $p < 0,05$  LSD-test.

Для самок линии C57Bl/6 не наблюдали различий в предпочтении ни в парном, ни в одиночном тестировании. Этот факт согласуется с полученными данными хроматографического анализа, где не удалось разделить образцы мочи от контрольных и антигенстимулированных самцов C57Bl/6 при использовании многомерной статистики.

## Взаимосвязь состава мочи с репродуктивными характеристиками самцов мышей

### *Беременность покрытых самок*

С точки зрения выживания популяции и передачи «хороших генов», важен не только сам факт покрытия, но и наступление беременности (фертильность покрытия). Анализ отдельных соединений, отличающихся

по содержанию у самцов, успешно покрывших 1 или 2 самки показал, что у самцов линии C57BL/6, покрывших 2 самки, наблюдалось повышенное содержание ацетофенона ( $p=0,05$ ), а у самцов линии BALB/c, покрывших 2 самки, наблюдалось повышенное содержание  $\alpha,\alpha$ -диметил бензолметанола ( $p<0,05$ ). При помощи многомерной статистики, выполненной для всех 34 соединений удалось разделить группы самцов с наличием и отсутствием фертильных покрытий (рис.4). Анализ при помощи LSD-теста выявил значимые различия между группами наличия/отсутствия беременности для каждой из исследованных линий.

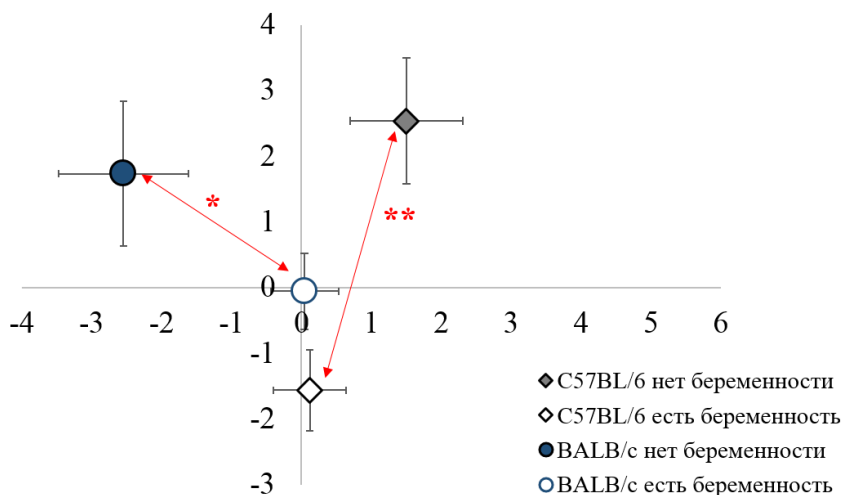


Рис.4. Распределение индивидуальных паттернов ЛОС самцов в пространстве осей Y2 и Y3 PLS DA в зависимости от успешности (фертильности) их покрытий.

Трехфакторный дисперсионный анализ с последующим использованием LSD-теста показал предпочтение самками линии BALB/c самцов, способных оставить потомство, по сравнению с самцами без фертильных покрытий. Это выразилось в большем количестве подходов ( $p<0,001$ ) и большем времени обнюхивания ( $p<0,01$ ) мочи таких самцов, в одиночном тестировании. При этом, для линии C57BL/6 каких-либо различий в поведенческих реакциях самок на стимулы от самцов, способных оставить потомство, и самцов, чьи покрытия не привели к беременности самки, не наблюдалось, несмотря на наличие различий между паттернами мочи этих групп самцов.

Таким образом, многомерный анализ по 34 пикам летучих соединений позволил различить группы с фертильными покрытиями и без таковых для обеих исследуемых линий. При этом, стимулы самцов, способных оставить потомство, оказывались более привлекательны только для самок линии Balb/c, тогда как самки C57BL/6 не различали самцов по данному признаку.

### *Развитие эмбрионов*

Количество эмбрионов различалось между линиями. В группу «меньше медианы» у линии C57BL/6 попали пометы от 1 до 6 эмбрионов, у линии BALB/c – от 1 до 5 эмбрионов. В группу «больше медианы» у линии C57BL/6 от 7 до 10 эмбрионов, у линии BALB/c – от 6 до 9 эмбрионов. Масса эмбрионов различалась у исследуемых линий. В группу «меньше медианы» у линии C57BL/6 попали пометы со средней массой эмбриона от 541 мг до 615 мг, у линии BALB/c – от 434 мг до 482 мг. В группу «больше медианы» у линии C57BL/6 от 615 мг до 843 мг, у линии BALB/c – от 482 мг до 607 мг.

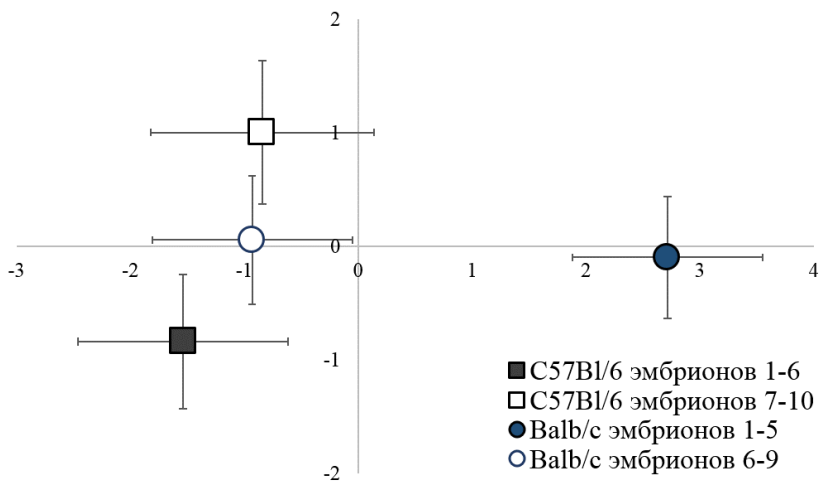


Рис.5. Распределение индивидуальных паттернов ЛОС самцов в пространстве осей Y2 и Y3 PLS DA в зависимости от числа эмбрионов в потомстве самца.

Индивидуальный анализ по каждому компоненту мочи не выявил различий между отцами с большим и меньшим количеством эмбрионов ни у одной из линий, тогда как по массе эмбрионов отличия были найдены для линии BALB/c. У самцов этой линии содержание этилбензола было выше

у отцов, чьи эмбрионы имели массу больше медианы ( $p < 0,05$ ). Тем не менее многомерный анализ позволил различить самцов, отличающихся по числу эмбрионов в потомстве (рис.5). Было обнаружено, что самцы C57BL/6, отличающиеся по числу эмбрионов, различались по третьей компоненте (Y1:  $p=0,572$ ; Y2:  $p=0,609$ ; Y3:  $p=0,041$ ), тогда как самцы BALB/c - по второй (Y1:  $p=0,587$ ; Y2:  $p=0,005$ ; Y3:  $p=0,847$ ). При PLS DA анализе различий между соединениями мочи самцов, имеющих разную массу эмбрионов в потомстве различия были найдены только для отцов линии BALB/c (Y1:  $p=0,117$ ; Y2:  $p=0,000$ ; Y3:  $p=0,886$ ), но не C57BL/6 (Y1:  $p=0,376$ ; Y2:  $p=0,253$ ; Y3:  $p=0,133$ ).

Трехфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями ANOVA Repeated measures поведения самок в ольфакторных тестах показал значимое влияние количества эмбрионов в потомстве самца на количество и время обнюхивания самками его мочи в тестах ольфакторного выбора (рис.6). Сравнения при помощи LSD-теста выявили, что самки линий BALB/c и C57BL/6 в обоих типах теста предпочитают самцов, в потомстве которых было зарегистрировано меньшее количество эмбрионов. Это выражалось в большем количестве подходов ( $p < 0,01$  и  $p < 0,01$ , для одиночного и парного тестирования соответственно) и времени обнюхивания ( $p < 0,001$  и  $p < 0,01$ , для одиночного и парного тестирования соответственно) стимулов самками линии BALB/c, а также в большем количестве подходов и меньшем латентном времени у самок C57BL/6 ( $p < 0,05$  и  $p < 0,05$  соответственно).

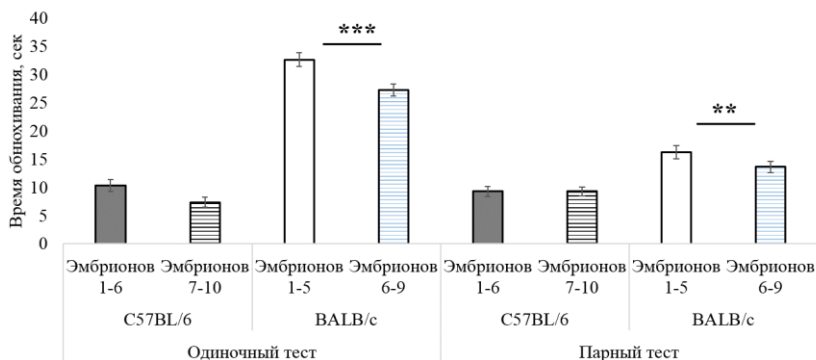


Рис.6. Время обнюхивания образцов мочи самцов в зависимости от количества эмбрионов в их потомстве. LSD-test \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ .

Масса эмбрионов в потомстве самца не оказывала значимого влияния на поведение самок в тестах ольфакторного предпочтения ( $F(1, 53)=0,99$ ,

$p=0,324$  ANOVA Repeated measures), несмотря на наличие разницы как в содержании отдельных веществ, так и их паттернов в моче этих самцов.

Таким образом, самки обеих исследуемых линий различают самцов с разным количеством потомков, предпочитая отцов с меньшим числом потомков, что согласуется с данными анализа только совокупности, но не отдельных компонентов мочи. При этом масса тела эмбрионов в потомстве самцов не связана с их предпочитаемостью интактными самками, не смотря на наличие химической основы для их дискриминации.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что состав мочи самцов и ее привлекательность для самок существенным образом зависят от репродуктивных показателей самца, его опыта взаимодействия с половым партнером, а также способности противостоять внешним инфекционным агентам путем активации иммунной системы. Причем эти реакции являются генетически детерминированными и по-разному реализуются у двух исследуемых линий. Было выявлено, что после контакта с самкой в моче самцов C57BL/6 отмечается значимое снижение уровня 5 из 34 детектируемых соединений, тогда как в аналогичной ситуации у самцов BALB/c снижение отмечается уже для 22 из 34 соединений, причем уровень 2 соединений даже растет. Несмотря на снижение разного числа компонентов мочи, самки обеих линий не демонстрируют снижения ольфакторной привлекательности самцов в одиночном тестировании, что дает основание для поиска сигнальных соединений среди не снижающихся компонентов мочи. В пользу этого предположения свидетельствует неснижаемый уровень двух детектируемых феромонов мышей, SBT и экзобревицина, сигнальная роль которых была ранее показана многими исследователями.

Состояние иммунной системы является значимым фактором, который оказывает существенное влияние на весь организм животного и функционирование его отдельных систем. Активация иммунной системы самца введением гемоцианина приводила к существенному изменению компонентного состава мочи, причем только у самцов линии BALB/c. В ольфакторном тестировании также самки только этой линии могли дискриминировать образцы мочи контрольных и иммунизированных самцов. Для линии C57BL/6 не было эффектов иммунизации как на состав мочи, так и на реакцию самок в тесте ольфакторного выбора.

Морфо-физиологические особенности животных неминуемо реализуются в репродуктивном поведении и способности оставить конкурентоспособное потомство. Инструментальный анализ образцов мочи животных исследуемых линий с высокой достоверностью



дискриминировал самцов способных к фертильным покрытиям. При этом в ольфакторном тесте самки проявляли больший интерес к запаху самцов, которые смогли покрыть самок. Однако только самки линии BALB/c отличали самцов, покрытия которых заканчивалось беременностью.

Количество потомков у самцов как линии C57BL/6, так и BALB/c было связано с компонентным составом мочи и предпочтениями самок. Анализ ольфакторного тестирования выявил, что самки исследуемых линий предпочитали самцов с меньшим числом зачатых потомков. При этом масса потомков самцов не имела значения для предпочтений самок обеих линий, а компонентный состав мочи изменялся только у самцов BALB/c.

В целом, полученные результаты позволяют заключить, что моча самцов различных генотипов по-разному отражает их функциональное состояние и репродуктивный потенциал. Это находит подтверждение в химическом составе мочи и ольфакторном предпочтении самок и свидетельствует о высокой значимости сигналов мочи для полового отбора.

## **ВЫВОДЫ**

1. Функциональное состояние и репродуктивный потенциал находят отражение в компонентном составе мочи самцов мышей линий C57BL/6 и BALB/c.
2. Самки линии BALB/c по сравнению с самками C57BL/6 проявляют большую активность при исследовании запаха мочи самцов, а также способны более эффективно дискриминировать предъявляемые стимулы.
3. Функциональные особенности исследуемых генетических линий C57BL/6 и BALB/c определяют ольфакторную реакцию самок, которые более эффективно дискриминируют запахи самцов при парном предъявлении.
4. Опыт взаимодействия самцов с самками находит отражение в структуре их запаховой метки и ее привлекательности в ольфакторном тесте, причем стимулы от наивных самцов более привлекательны для самок BALB/c, тогда как стимулы от опытных самцов оказываются более предпочтительными для самок C57BL/6.
5. Активация иммунной системы самцов линии BALB/c введением гемоцианина приводит к существенному изменению компонентного состава их мочи и делает ее менее привлекательной для самок в парном ольфакторном тесте, по сравнению с запахом мочи контрольных животных.
6. Компонентный состав мочи отражает репродуктивный успех самцов и является надежным индикатором количества покрытий, совершаемых самцом, а также числа эмбрионов, их массы и массы их плацент.

## ПУБЛИКАЦИИ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Khotskina A.S.**, Patrushev Y.V., Yusupova D.I., Gerlinskaya L.A., Petrovskii D.V., Moshkin M.P., Zavjalov E.L. Immunization of Male BALB/c and C57BL/6 Mice Alters the Composition of Their Urine and the Response of Females to Its Odor // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2024. – Т. 60. – №. 4. – С. 1336-1346;
2. **Khotskina A.S.**, Patrushev Y.V., Yusupova D.I., Gerlinskaya L.A., Maslennikova S.O., Petrovskii D.V., Moshkin M.P., Zavjalov E.L. Female BALB/c Mice Prefer the Odor of Mates Producing Fewer Progeny // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2024. – Т. 60. – №. 2. – С. 526-535.

Результаты работы были представлены на 2-х российских и одной международной научных конференциях.

1. Завьялов Е.Л., **Хоцкина А.С.**, Юсупова Д.И., Петровский Д.В. Хемосигналы грызунов в природе и в условиях лабораторного разведения // Девятая конференция специалистов по лабораторным животным (Rus-LASA-9), Сколково 2021. – С. 30.

2. Zavjalov E.L., **Khotskina A.S.**, Petrovskii D.V., Zavyalova Y.L., Moshkin M.P. Strains dependent behavioural responses of females mice to urine of antigen-treated males// Laboratory Animals. 2019. – V.53. – №1. (14th FELASA Congress, 2019, Abstract book). – P. 53.

3. **А.С. Доценко**, Е.Л. Завьялов, Д.В. Петровский, Л.А. Герлинская, С.О. Масленникова, Ю.В. Патрушев, И.Е. Колосова, М.П. Мошкин Поведенческие и акустические реакции самок линий BALB/c и C57BL на половые хемосигналы // Материалы конференции [III Ежегодная конференция специалистов по работе с лабораторными животными (Rus-LASA)]. Новосибирск. 2013. – С. 18.