

## САМКИ МЫШЕЙ BALB/С ПРЕДПОЧИТАЮТ ЗАПАХ ПАРТНЕРОВ, ОТ КОТОРЫХ РОЖДАЕТСЯ МЕНЬШЕ ПОТОМКОВ

©2024 г. А. С. Хоцкина<sup>1,\*</sup>, Ю. В. Патрушев<sup>2</sup>, Д. И. Юсупова<sup>1</sup>, Л. А. Герлинская<sup>1</sup>,  
С. О. Масленникова<sup>1</sup>, Д. В. Петровский<sup>1</sup>, М. П. Мошкин<sup>1</sup>, Е. Л. Завьялов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики Сибирского отделения  
Российской академии наук”, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Федеральный исследовательский центр  
“Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук”, Новосибирск, Россия

\*e-mail: dotcenko@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 06.02.2024 г.

После доработки 13.03.2024 г.

Принята к публикации 17.03.2024 г.

Выбор партнера является одним из чрезвычайно важных этапов полового отбора. Свободный выбор партнера, как правило, обеспечивает рождение наиболее жизнеспособного потомства. Так, в опытах на разных видах животных установлено, что выживаемость от момента рождения до достижения половой зрелости существенно выше у особей, рожденных при скрещивании в соответствии со свободным поведенческим выбором партнера, по сравнению с таковой при скрещивании вопреки выбору. Совершая свой выбор, самка может опираться на визуальные, слуховые или обонятельные сигналы. Но в настоящий момент в экспериментах с оценкой полового выбора используют взаимодействие с животным, а не с отдельными его сигналами, что не позволяет определить конкретный вклад каждого из них. Известно, что для грызунов решающую роль во внутривидовых взаимодействиях играет запах. По запаху особи способны распознать пол, репродуктивный статус, генотип, диету, а также состояние здоровья конспецифика. На данный момент крайне мало работ связывают конкретные сигналы, исходящие от самца, с информацией о его отцовских эффектах. В своей работе мы оценили репродуктивный выход самцов, имевших возможность спаривания с двумя самками, по числу живых эмбрионов, их массе и массе их плацент. Затем летучую фракцию мочи этих самцов оценивали наивные самки в ольфакторных тестах. Образцы мочи самцов также были проанализированы при помощи хромато-масс-спектрометрического анализа. Оказалось, что наивные самки линии BALB/с предпочитают самцов, беременность от которых являлась малопродуктивной, по сравнению с самцами, беременность от которых являлась многопродуктивной. Возможность различить данные группы самцов была подтверждена инструментальным методом анализа. В то же время самки линии C57BL/6 не различали данные группы самцов. Другие параметры беременности не влияли на предпочтения самками мочи самцов.

*Ключевые слова:* ольфакторное предпочтение полового партнера, ольфакторный тест, линия мышей BALB/с, линия мышей C57BL/6

DOI: 10.31857/S0044452924030036, EDN: YXТOKC

### ВВЕДЕНИЕ

Выбор партнера является одним из чрезвычайно важных этапов полового отбора, который необходим для поддержания внутривидовой морфофункциональной изменчивости и устойчивого существования вида в постоянно меняющейся среде обитания [1]. Свободный выбор партнера, как правило, обеспечивает рождение наиболее жизнеспособного потомства. Так, в опытах с участием разных видов животных было установлено, что выживаемость в неонатальный и постнатальный периоды значительно выше у особей, рожденных при спаривании в соответствии со свободным поведенческим выбором полового партнера, по сравнению с размножением с ограничением или отсутствием выбора [2–4].

Вклад самца в эти процессы ранее теоретически ограничивался лишь передачей “хороших генов”, либо генетической совместимостью с материнским организмом, как, например, в случае с генами главного комплекса гистосовместимости (МНС – main histocompatibility complex) [5]. В последнее десятилетие появилось большое количество исследований, которые демонстрируют, что не только генотип самца может оказывать влияние на потомков [6, 7]. Отмеченные в работах отцовские эффекты, а именно – процессы, происходящие во взрослом отцовском организме, которые влияют на состояние потомков, могут быть реализованы разными путями: через состав спермальной жидкости [6], через эпигенетические модификации генома гамет [8, 9], через активаци-

цию сигналами самца физиологических процессов в организме матери, влияющих на ход беременности и заботу о потомстве [10, 11]. Влияние онтогенеза самца на его потомство объясняет наличие отцовских эффектов даже у генетически идентичных животных [7, 12, 13].

Данные многочисленных исследований свидетельствуют о том, что выбор самкой полового партнера имеет селективный характер, и ключевую роль в этом процессе играют физиологические механизмы дистанционной рецепции [11, 14]. В зависимости от таксономической принадлежности и видоспецифического образа жизни самки используют зрительные, слуховые или обонятельные анализаторы при выборе генетически комплементарного, либо наиболее адаптированного к конкретным условиям окружающей среды полового партнера [15]. Однако было установлено, что у большинства видов грызунов в качестве важнейшего сигнального фактора все же выступает запах [14]. Согласно Clutton-Brock, репродуктивный успех — это количество копий генов, переданных следующему поколению, которое также способно к размножению [16]. Репродуктивный успех самца во многом определяется его способностью владеть ключевыми ресурсами среды обитания, включая корм, убежища и живущих на контролируемой им территории самок, которые, как правило, имеют меньшие, чем самцы, индивидуальные участки [17]. Так, самки лабораторных мышей [18], а также рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus*) демонстрируют большее предпочтение по отношению к доминантным самцам, основывая свой выбор именно на запахе мочи [19], при помощи которой самцы активно метят ареал своего обитания. На данный момент опубликованы десятки работ, устанавливающих связь между физиологическими характеристиками самца и компонентным составом его мочи [20–23]. При этом связь состава мочи и репродуктивных характеристик самца остается практически не изученной.

В данной работе мы задались целью связать показатели предпочтения самками мочевых меток самцов с характеристиками потомства, рожденного от тестируемых самцов. Для исключения влияния индивидуального генотипа животных на предпочтения полового партнера работа выполнена только с использованием инбредных линий лабораторных мышей BALB/с и C57BL/6.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Содержание животных*

Исследование выполнено на базе ЦКП SPF-вариант ИЦиГ СО РАН. В данной работе были использованы самцы и самки линий мышей BALB/с и C57BL/6 в возрасте 8–10 недель на момент начала исследования. Животных содержали в индиви-

дуально вентилируемых клетках (OptiMice, Animal Care, США) группами по 2–5 особей до начала экспериментов при свободном доступе к воде и гранулированному корму для мышей (“Чара”, Павлов-Посад), искусственном фотопериоде 14С:10Т, температуре 22–24 °С и относительной влажности 30–70 %. В качестве подстилочного материала использовали березовые гранулы (ООО “Альбион”, Новосибирск). Корм и подстилочный материал поступали к животным после стерилизации методом автоклавирования при 121 °С. Воду очищали при помощи фильтрационной системы Millipore. 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*

К 26 самцам линии BALB/с и 26 самцам линии C57BL/6, которые содержались одиночно в клетке, подсаживали по 2 интактные самки соответствующей линии для установления репродуктивных качеств исследуемых самцов. Покрытых самок сразу же отсаживали от самца и содержали одиночно до 16 суток беременности, затем проводили эвтаназию и некропсию (определяли количество плодов, их массу и массу их плацент). Покрытие самки определяли по наличию вагинальной пробки.

Сбор образцов мочи самцов для проведения ольфакторных тестов и хроматографического анализа, проводили после каждого обнаруженного покрытия. Самцов помещали на чашку Петри, выделение мочи при отсутствии мочеиспускания стимулировали путем поглаживания в нижней части живота. Все собранные образцы незамедлительно замораживали и хранили при температуре –80 °С в течение 4–6 недель до последующего тестирования.

### *Оценка репродуктивного выхода*

За 6 дней совместного содержания с двумя самками 25 из 26 самцов BALB/с совершили покрытия, у 17 из этих самцов они привели к беременности самок (11 самцов оплодотворили одну, и 6 самцов — двух самок). Самцов разбили на группы — с маленькими и большими пометами, вычисляя медианное значение среди полученных размеров помета. У двух самцов, покрывших две самки, показатель одной из них был меньше медианного значения, а у другой — больше медианного. Оба самца при расчетах были определены в группу с большими пометами.

Из 26 самцов линии C57BL/6 20 совершили покрытия, 11 из которых завершились беременностью. У всех этих самцов только одна самка имела потомство.

#### *Проведение ольфакторного тестирования*

В ольфакторном тестировании были задействованы 36 самок линии BALB/c и 48 самок C57BL/6. За сутки до тестирования самок рассаживали по индивидуальным клеткам.

Тестируемую мочу самцов размораживали в течение 1 часа при комнатной температуре. Далее подготавливали стимул: наносили на фильтровальную бумагу размером 5 мм × 30 мм 20 мкл мочи и помещали в усеченный на 5 мм наконечник для автоматической пипетки объемом 1 мл. Верх наконечника закрывали плотным шариком из ваты. Данные манипуляции проводили для того, чтобы у самки не было прямого доступа к моче: таким образом, самка могла анализировать только летучие соединения мочи. Самки исследовали мочу самцов только своей линии.

Стимулы помещали в углу домашней клетки животного, на расстоянии по 5 см от ближайших сторон клетки, закрепляя прищепками на крышке клетки таким образом, чтобы мышь могла дотянуться до кончика для обнюхивания. Тестирование проводили в течение 10 минут, в темную фазу при красном освещении, результаты записывали на видеокамеру. Каждый стимул предъявляли трем разным самкам для увеличения надежности получаемых статистических данных. Одна самка исследовала только один стимул и участвовала в тестировании только один раз. В поведении самки анализировали общее количество подходов и общее время обнюхивания стимула.

Сразу после каждого ольфакторного тестирования у самок определяли стадию эстрального цикла [24], так как известно, что стадия цикла самки может оказать влияние на ее поведение в ольфакторных тестах [11]. Полученные данные нормировали, вычитая из количества подходов каждой самки среднegrupповое значение количества подходов, рассчитанное для каждой из 4 стадий цикла и прибавляя среднее, рассчитанное без учета стадии цикла. Аналогичное преобразование проводили для времени обнюхивания.

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

Хромато-масс-спектрометрическим анализом исследовали 35 проб мочи и 8 проб воздуха в помещении. Для концентрирования пробы использовали трубку – концентратор из нержавеющей стали с сорбентом Tenax TA. Пробу объемом 20 мкл переносили в стеклянную вialу, объемом 4 мл и продували

аргоном с объемной скоростью 40 мл/мин при температуре 60°C. Поток аргона с парами пробы через кварцевый капилляр подавался в трубку-концентратор, где происходила адсорбция компонентов пробы на сорбенте концентратора. Время адсорбции – 20 мин. Температура сорбции – 25°C. Для ввода пробы в хроматографическую колонку использовали термодесорбер UNITY Series2 (Markes), температура десорбции – 250°C.

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. Условия: 3 мин при температуре 40°C, затем повышение температуры со скоростью 7°/мин до 250°C. 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.

#### *Статистическая обработка данных*

Статистический анализ полученных данных был выполнен с использованием пакета STATISTICA 6.0. Для выбора используемых статистических методов устанавливали нормальность распределения признаков по критерию Колмогорова–Смирнова. Для обработки данных ольфакторного тестирования использовали анализ повторяющихся образцов Repeated Measure ANOVA, вычисляли мощность полученных критериев (1-β). Парное сравнение исследуемых групп проводили при помощи критерия Тьюки (HSD-тест).

При анализе отдельных летучих органических соединений (ЛОС) мочи самцов использовали ANOVA и коэффициент корреляции Пирсона. Для интегральной характеристики паттернов ЛОС число исходных переменных было уменьшено с помощью дискриминантного анализа частичных наименьших квадратов (PLS-DA), который широко используется в биологических и медицинских исследованиях, поскольку позволяет максимизировать разделение между группами наблюдения [25]. PLS-DA строит модель линейной регрессии, проецируя переменные в новое пространство, где Y является категориальной переменной [26]. Затем проводили двухфакторный дисперсионный анализ со значениями Y в качестве зависимой переменной, чтобы оценить распределение экспериментальных групп в пространстве осей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### *Хроматографический анализ образцов мочи*

Индивидуальные хроматограммы мочи интактных самцов насчитывали от 34 до 55 пиков (рис. 1). В общей сложности удалось зафиксировать 81 уникальный пик. Часть соединений, будучи продуктами

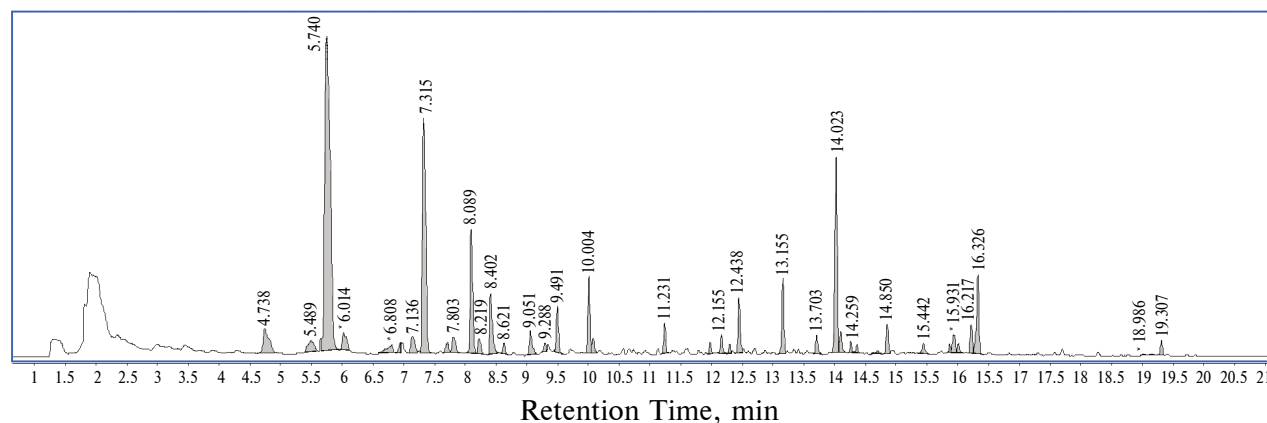


Рис. 1. Пример хроматограммы мочи самца линии BALB/с.

обмена веществ не только мышей, присутствовали в воздухе лабораторных помещений и также детектировались хроматографом, поэтому из дальнейших расчетов были исключены соединения, площадь пиков которых в моче обеих исследуемых линий, не превышала таковые в пробах воздуха. Всего для дальнейших расчетов было выделено 32 пика.

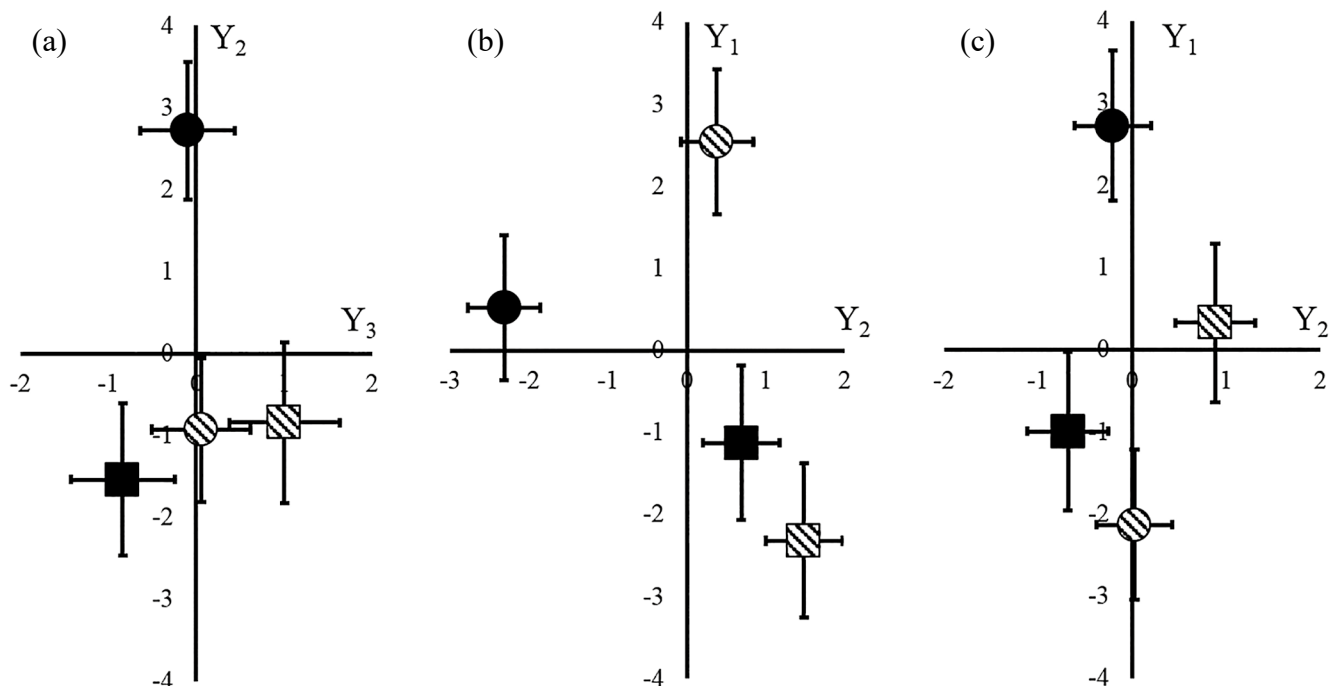
Хроматографические профили отдельных животных совпадали на 88% у самцов линии BALB/с (индивидуальные корреляции пиков  $0.939 < r < 0.998$ ) и на 70% у самцов линии C57BL/6 (индивидуальные корреляции пиков  $0.839 < r < 0.997$ ).

Масс-спектрометрический анализ проводили для всех пиков для каждого исследуемого образца. Из 32 выбранных соединений 30 пиков были полностью идентифицированы, в том числе были обнаружены два феромона самцов мышей: SBT и экзобревикомин. При исследовании образцов мочи самцов разных линий были обнаружены компоненты, детектируемые только у одной из исследуемых линий животных. Так, декан, ундекан и додекан присутствовали в моче самцов только линий мышей BALB/с, тогда как 1-[2-(2-метокси-1-метилэтокси)-1-метилэтокси]-пропан-2-ол и его стереоизомер были обнаружены в моче самцов только линии C57BL/6. Среди веществ, детектируемых у обеих линий, моча самцов различалась по содержанию 9 компонентов: нонан ( $F_{(1,33)} = 19.52$ ,  $p = 0.000$ ,  $1 - \beta = 0.99$ ), диметилсульфон ( $F_{(1,33)} = 28.81$ ,  $p = 0.000$ ,  $1 - \beta = 0.99$ ), 1-этил-3-метил-бензол ( $F_{(1,33)} = 4.40$ ,  $p = 0.04$ ,  $1 - \beta = 0.53$ ), декан ( $F_{(1,33)} = 7.60$ ,  $p = 0.01$ ,  $1 - \beta = 0.76$ ), экзобревикомин ( $F_{(1,33)} = 46.87$ ,  $p = 0.000$ ,  $1 - \beta = 0.99$ ), ацетофенон ( $F_{(1,33)} = 9.76$ ,  $p = 0.004$ ,  $1 - \beta = 0.86$ ), о-толуидин ( $F_{(1,33)} = 19.06$ ,  $p = 0.000$ ,  $1 - \beta = 0.99$ ),  $\alpha$ ,  $\alpha$ -диметил бензолметанол ( $F_{(1,33)} = 5.32$ ,  $p = 0.03$ ,  $1 - \beta = 0.61$ ), N-фенил-формамид ( $F_{(1,33)} = 10.91$ ,  $p = 0.002$ ,  $1 - \beta = 0.89$ ). Примечательно, что известный феромон – экзобревикомин, а также 1-этил-3-метил-бензол,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -диметил бензо-

лметанол, декан и N-фенил-формамид были обнаружены в большем количестве в моче самцов линии BALB/с, тогда как количество остальных 4 соединений было большее в моче самцов C57BL/6.

Для дальнейшего анализа животные были разбиты по медианному значению каждого из репродуктивных показателей. По количеству эмбрионов были сформированы две группы самцов – имеющих “маленькие пометы” (у линии C57BL/6 от 1 до 6 эмбрионов, у линии BALB/с – от 1 до 5 эмбрионов) и “большие пометы” (у линии C57BL/6 от 7 до 10 эмбрионов, у линии BALB/с – от 6 до 9 эмбрионов). В группу “маленькая масса” линии C57BL/6 попали пометы со средней массой эмбриона от 541 мг до 615 мг, для линии BALB/с – от 434 мг до 482 мг, а в группу “большая масса” линии C57BL/6 – от 615 мг до 843 мг, для линии BALB/с – от 482 мг до 607 мг. Средняя масса плаценты на 16 сутки беременности также различалась между линиями мышей. В группу “маленькая масса плаценты” линии C57BL/6 попали пометы со средней массой плацент от 97 мг до 112 мг, для линии BALB/с – от 122 мг до 132 мг, а в группу “большая масса плаценты” линии C57BL/6 – от 112 мг до 134 мг, для линии BALB/с – от 132 до 157 мг.

Известно, что некоторые физиологические состояния могут быть закодированы относительным содержанием нескольких компонентов [21]. Для установления возможности разделения выбранных групп самцов по общей композиции соединений их мочи был использован метод PLS DA по всем 32 детектированным компонентам. HSD-тест не выявил значимых различий между самцами C57BL/6, отличающимися размером помета (Y1:  $p = 0.94$ ; Y2:  $p = 0.96$ ; Y3:  $p = 0.17$ ). При этом различия между компонентами мочи у самцов BALB/с (Y1:  $p = 0.95$ ; Y2:  $p = 0.03$ ; Y3:  $p = 0.99$ ) были зарегистрированы по второй компоненте (рис. 2а). При анализе различий между компонентами мочи самцов, имеющими разную мас-



**Рис. 2.** Распределение индивидуальных паттернов ЛОС самцов в пространстве осей PLS. (a): заполненный квадрат – самцы C57BL/6 с маленькими пометами, квадрат со штриховкой – самцы C57BL/6 с большими пометами, заполненный круг – самцы BALB/c с маленькими пометами, круг со штриховкой – самцы BALB/c с большими пометами. (b): заполненный квадрат – самцы C57BL/6 с маленькой массой плодов, квадрат со штриховкой – самцы C57BL/6 с большой массой плодов, заполненный круг – самцы BALB/c с маленькой массой плодов, круг со штриховкой – самцы BALB/c с большой массой плодов. (c): заполненный квадрат – самцы C57BL/6 с маленькой массой плацент у плодов, квадрат со штриховкой – самцы C57BL/6 с большой массой плацент у плодов, заполненный круг – самцы BALB/c с маленькой массой плацент у плодов, круг со штриховкой – самцы BALB/c с большой массой плацент у плодов.

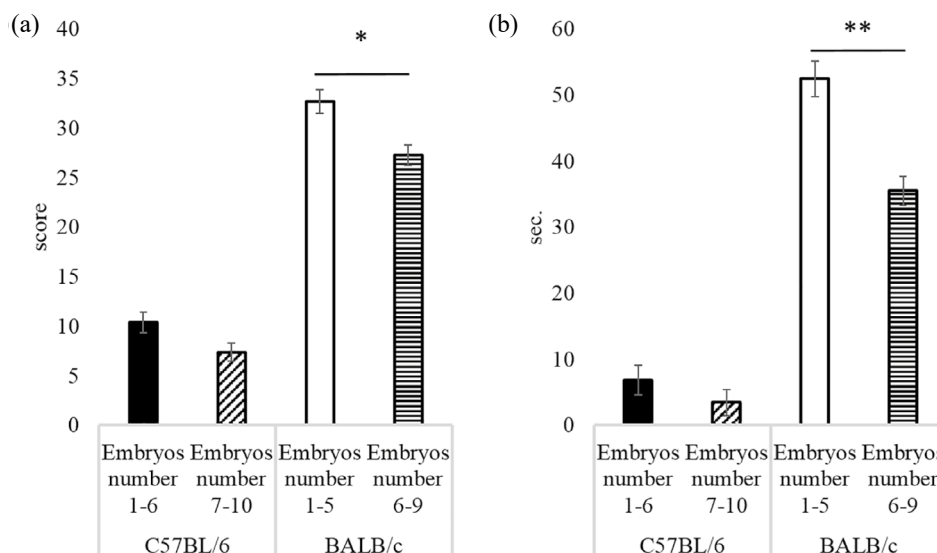
су эмбрионов в потомстве сравнение при помощи HSD-теста показало отсутствие различий между самцами линии C57BL/6 по всем трем компонентам ( $Y_1$ :  $p=0.83$ ;  $Y_2$ :  $p=0.72$ ;  $Y_3$ :  $p=0.37$ ). Для самцов линии BALB/c вклад массы эмбрионов был достоверным для второй компоненты ( $Y_1$ :  $p=0.93$ ;  $Y_2$ :  $p=0.04$ ;  $Y_3$ :  $p=0.99$ ) (рис. 2b). Различия между самцами C57BL/6, отличающимися по массе плацент у потомства, наблюдались по третьей компоненте ( $Y_1$ :  $p=0.74$ ;  $Y_2$ :  $p=0.68$ ;  $Y_3$ :  $p=0.05$ ), в то время как для групп самцов линии BALB/c – по первой и второй компоненте ( $Y_1$ :  $p=0.001$ ;  $Y_2$ :  $p=0.03$ ;  $Y_3$ :  $p=0.99$ ) (рис 2c).

При анализе различий в компонентном составе мочи между сформированными группами самцов не было обнаружено отличий по присутствию отдельных компонентов.

Анализируя количественное содержание каждого компонента в отдельности, не удалось разделить самцов в зависимости от размера их помета. Масса эмбрионов в помете самцов была связана с количественным содержанием этилбензола ( $F_{(1, 18)}=9.57$ ,  $p=0.01$ ,  $1-\beta=0.83$ ) в моче их отцов линии BALB/c, но данные результаты не наблюдались для самцов линии C57BL/6. Количество этилбензола и 3-гептен-2-она было связано с массой плаценты плодов и было выше только у самцов линии BALB/c ( $F_{(1, 18)}=6.00$ ,  $p=0.03$ ,  $1-\beta=0.64$ ), чьи эмбрионы имели массу плацент больше медианы. Таким образом, используя отдельные компоненты мочи, не удается различить группы самцов линии C57BL/6 ни по одному из выбранных признаков, тогда как

**Таблица 1.** Результаты двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA Repeated measures поведения самок линий C57BL/6 и BALB/c в ольфакторных тестах

Фактор	Количество подходов	Время обнюхивания
Линия	$F_{(1,24)} = 245.98, p < 0.001, 1-\beta = 1.00$	$F_{(1,24)} = 216.18, p < 0.001, 1-\beta = 1.00$
Размер помета	$F_{(1,24)} = 11.85, p = 0.002, 1-\beta = 0.91$	$F_{(1,24)} = 15.73, p < 0.001, 1-\beta = 0.97$
Линия*Размер помета	$F_{(1,24)} = 1.40, p = 0.248, 1-\beta = 0.21$	$F_{(1,24)} = 7.24, p = 0.01, 1-\beta = 0.73$



**Рис. 3.** (а) – Количество подходов к образцам мочи самцов в зависимости от количества эмбрионов в их потомстве. (б) – Время обнюхивания образцов мочи самцов в зависимости от количества эмбрионов в их потомстве. HSD-test \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$

самцов линии BALB/c возможно различить по массе потомков и массе их плацент.

#### *Поведенческие реакции самок на мочу самцов*

Двухфакторный дисперсионный анализ 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 предпочтения (табл. 1).

Последующие сравнения при помощи post hoc критерия Тьюки выявили, что самки линии BALB/c, но не C57BL/6 предпочитают самцов, в потомстве которых было зафиксировано меньшее количество эмбрионов. Это выражалось в большем количестве подходов и времени обнюхивания стимулов самками линии BALB/c (рис. 3а, б).

В то же время не было обнаружено взаимосвязи реакции самок на мочу самца в ольфакторных тестах и массы эмбрионов в потомстве тестируемых самцов ( $F_{(1,24)} = 1.21$ ,  $p = 0.283$  для количества подходов,  $F_{(1,24)} = 1.08$ ,  $p = 0.309$  для времени обнюхивания), несмотря на наличие разницы в паттернах соединений мочи самцов линии BALB/c (рис. 2б). Последующие сравнения при помощи HSD-теста подтвердили отсутствие значимых различий.

Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA Repeated measures поведения самок в ольфакторных тестах не выявил значимой связи между массой плаценты в потомстве самца и поведением самок в тестах ольфакторного предпочтения ( $F_{(1,24)} = 0.04$ ,  $p = 0.84$  для количества подходов,  $F_{(1,24)} = 0.82$ ,  $p = 0.37$  для времени обнюхивания). Последующие сравне-

ния при помощи post hoc критерия Тьюки подтвердили отсутствие значимых различий в поведении самок несмотря на то, что химический состав образцов позволял дифференцировать данные группы по общей композиции (рис. 2б).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Моча имеет как летучие, так и нелетучие компоненты [27]. Ее состав неоднократно анализировался на жидкостных и газовых хроматографах с последующей расшифровкой состава при помощи референсных соединений или масс-спектрометрии, а также при помощи электрофореза для идентификации белковой фракции. Наиболее изученной является газовая составляющая мочи, список детектированных соединений в которой не раз публиковался исследователями [20–22]. При этом остается неясным – для передачи информации важна вся смесь или только некоторые ее составляющие. Так существуют работы, в которых различия между исследуемыми группами животных определялось наличием/отсутствием определенных компонентов [20]. Различия могли определяться и на основании количественного содержания некоторых компонентов смеси [20]. Или же значимость для дискриминации образцов приобретают группы соединений и их относительное содержание [21, 28, 29]. В нашей работе было продемонстрировано отсутствие различий в компонентном составе и относительном содержании каждого из веществ в отдельности при анализе групп самцов линии BALB/c различавшихся по количеству эмбрионов. Различия удалось установить только с привлече-

нием в анализ все 32 детектированных компонента. В то же время самки BALB/c были способны различить данные группы самцов в ольфакторном тесте, что позволяет предположить, что информация кодируется, главным образом, относительным содержанием группы компонентов мочи, а не их наличием или концентрацией отдельных веществ.

При работе с лабораторными животными, а тем более с инбредными линиями, всегда есть опасность выявления не общих закономерностей, а индивидуальной реакции конкретной линии, основанной на особенностях ее генотипа. Поэтому важно проводить сравнительные исследования генетически контрастных животных. Выбор линий C57BL/6 и BALB/c для изучения влияния репродуктивного успеха самцов мышей на химический состав и сигнальные свойства их мочи был связан, с одной стороны, с широким использованием этих линий в научных экспериментах, а с другой, — с функциональными особенностями животных этих линий. Прежде всего стоит отметить отличие двух исследуемых линий по МНС-локусам: H-2b у C57BL/6 и H-2d у BALB/c, что определяет различия в продукции цитокинов Т-клетками при развитии иммунной реакции [30], а также отличия в продукции рецепторов В-лимфоцитами, макрофагами и дендритными клетками [31], что в совокупности приводит к различным путям реакции иммунной системы, которая, в свою очередь, играет весьма значимую роль в течении беременности и при взаимодействии мать—плод [13, 32]. Также животные исследуемых линий существенно различаются по чувствительности к запаховым стимулам: мыши линии C57BL/6 на два порядка слабее реагируют на предъявляемые запахи, чем мыши линии BALB/c [33]. Это находит подтверждение в ольфакторных тестах, где мы наблюдали меньшую исследовательскую активность самок C57BL/6 по сравнению с самками BALB/c по отношению к образцам мочи самцов, что может свидетельствовать о их сниженной реакции на запаховые стимулы. Но не стоит исключать из рассмотрения и другие причины. Так было показано, что самцы линии C57BL/6 в моче имеют значительно выше содержание MUP по сравнению с BALB/c [34]. Помимо функции связывания летучих веществ мочи MUP обладают и собственной сигнальной функцией [22, 27, 34]. Постановка эксперимента с отсутствием прямого контакта с образцом исключает улавливание нелетучих компонентов образца мочи.

Репродуктивный успех определяется как количество копий генов, переданных следующему поколению, которое также способно к размножению [16]. Согласно данному определению, успех самца определяется количеством оставленных потомков. Оказалось, что репродуктивный успех самцов исследуемых линий, оцененный по числу их потомков, был связан с предпочтением их хемосигналов интактны-

ми самками. Так, мы наблюдали, что самки линии BALB/c предпочитали самцов, в потомстве которых наблюдалось меньшее количество эмбрионов. Тем не менее данный результат хорошо согласуется с гипотезой компенсации, выдвинутой Патрисией Говати и неоднократно подтверждавшейся впоследствии [3, 13, 35]. В данных работах было показано, что самки, размножающиеся с непредпочитаемыми самцами, повышали свой репродуктивный выход через увеличение числа овулировавших яйцеклеток. В исследовании Герлинской с соавторами (2007) было продемонстрировано, что самцы, имеющие большие затраты белка при маркировке (а значит, более привлекательные для самок и способные с большей вероятностью удержать свою территорию) имеют меньшее количество эмбрионов в потомстве, чем самцы с низкой белковой экскрецией [36].

В действительности не стоит забывать, что на репродуктивный успех влияет не только количество потомков, но и их жизнеспособность, а также способность впоследствии стать более конкурентоспособными в борьбе за полового партнера, оставить потомство и позаботиться о нем [37]. Помимо количества потомков исследователи часто используют характеристики потомства для описания репродуктивного успеха родителей, привлекая в анализ такие показатели, как масса тела потомков, их навыки в строительстве гнезд, способность к доминированию и т. д. — черты, которые, теоретически, позволяют выжить и более успешно размножиться данным особям, нежели их конкурентам [2, 13]. При этом вклад отца в развитие плода представляется достаточно значимым — экспрессия именно отцовских генов преобладает в плаценте [38]. А изменения в фенотипе отцов, отражающиеся в импринтировании генома, влияют на массу тела потомства, длину тела, массу плаценты и т. д. [39]. В настоящем исследовании также была обнаружена связь массы тела потомков и их плацент с отцовским фенотипом, а именно — запаховым профилем самцов. При этом масса тела потомков и их плацент не являлась значимым показателем для наивных самок при оценке мочи самца в ольфакторном тесте.

Таким образом, мы наблюдаем, что даже интактные инбредные животные имеют различия в проявлении фенотипических признаков. Такие параметры, как профиль летучих соединений в моче, способность покрывать самок, количество зачатых эмбрионов и параметры их развития — признаки, имеющие большую вариативность и зависящие не только от генотипа отца и матери. Выбирая полового партнера, самки могут получить информацию о некоторых его репродуктивных качествах, опираясь лишь на запаховый профиль мочевой метки самца. При этом более предпочтительным является спаривание, в результате которого будет зачато небольшое количество потомков, тогда как масса тела и плацен-

ты потомства самца не играет значимой роли при выборе партнера самкой на основе запаха его мочи.

#### ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е.Л.З., М.П.М., Л.А.Г.), сбор данных (Ю.В.П., С.О.М., А.С.Х.), обработка данных (А.С.Х., Д.В.П.), написание и редактирование манускрипта (А.С.Х., Д.И.Ю.).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данное исследование проведено в соответствии с международными правилами содержания и обращения с животными (Директива Европейского сообщества от 22.09.2010 – Directive 2010/63/EU) и одобрено межинститутской биоэтической комиссией Института цитологии и генетики СО РАН (протокол 8 от 19.03.2012).

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта (FWNR-2022-0004).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием животных ЦКП “SPF-виварий” и оборудования ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанная Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта — RFMEFI62119X0023).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Мошкин МП, Шилова СА* (2008) Разнокачественность особей как механизм поддержания стабильности популяционных структур. *Успехи современной биологии* 128: 307–320. [*Moshkin MP, Shilova SA* (2008) Raznokachestvennost' osobey kak mekhanizm podderzhaniya stabil'nosti populyatsionnykh struktur. *Uspekhi sovremennoy biologii* 128: 307–320].
2. *Drickamer LC, Gowaty PA, Wagner DM* (2003) Free mutual mate preferences in house mice affect reproductive success and offspring performance. *Animal Behaviour* 65: 105–114. <https://doi.org/10.1006/anbe.2002.2027>
3. *Gowaty PA, Anderson WW, Bluhm CK, Drickamer LC, Kim YK, Moore AJ* (2007) The hypothesis of reproductive compensation and its assumptions about mate preferences and offspring viability. *Proc Nat Acad Sci* 104: 15023–15027. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706622104>
4. *Raveh S, Sutalo S, Thonhauser KE, Thoß M, Hettyey A, Winkler F, Penn DJ* (2014) Female partner preferences enhance offspring ability to survive an infection. *BMC Evol Biol* 14: 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-14>
5. *Apanius V, Penn DJ, Slev PR, Ruff LR, Potts WK* (2017) The nature of selection on the major histocompatibility complex. *Critical Rev Immunol* 37: 75–125. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v37.i2-6.10>
6. *Dietz DM, LaPlant Q, Watts EL, Hodes GE, Russo SJ, Feng J, Oosting RS, Vialou V, Nestler EJ* (2011) Paternal transmission of stress-induced pathologies. *Biol Psychiatry* 70: 408–414. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.05.005>
7. *Gerlinskaya LA, Anisimova MV, Kontsevaya GV, Maslennikova SO, Romashchenko AV, Gong Y, Moshkin YM, Moshkin MP* (2020) Mating with immunised male mice affects the phenotype of adult progeny. *Reproduction* 160: 117–127. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0360>
8. *Dias BG, Ressler KJ* (2014) Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nat Neurosci* 17: 89–96. <https://doi.org/10.1038/nn.3594>
9. *Ou XH, Zhu CC, Sun SC* (2019) Effects of obesity and diabetes on the epigenetic modification of mammalian gametes. *J Cel Physiol* 234: 7847–7855. <https://doi.org/10.1002/jcp.27847>
10. *Curley JP, Mashoodh R, Champagne FA* (2011) Epigenetics and the origins of paternal effects. *Horm Behav* 59: 306–314. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.06.018>
11. *Koyama S* (2016) Primer Effects by Murine Pheromone Signaling: Pheromonal Influences on Reproductive Conditions. Springer.
12. *Alter MD, Gilani AI, Champagne FA, Curley JP, Turner JB, Hen R* (2009) Paternal transmission of complex phenotypes in inbred mice. *Biol Psychiatry* 66: 1061–1066. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.05.026>
13. *Gerlinskaya LA, Maslennikova SO, Anisimova MV, Feofanova NA, Zavjalov EL, Kontsevaya GV, Moshkin YM, Moshkin MP* (2017) Modulation of embryonic development due to mating with immunised males. *Reproduct Fertility Devel* 29: 565–574. <http://dx.doi.org/10.1071/RD15173>
14. *Penn D, Potts WK* (1998) Chemical signals and parasite-mediated sexual selection. *Trends Ecol Evol* 13: 391–396. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01473-6](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01473-6)
15. *Dougherty LR* (2020) Designing mate choice experiments. *Biol Rev* 95: 759–781. <https://doi.org/10.1111/brv.12586>
16. *Clutton-Brock TH* (1988). *Reproductive success: studies of individual variation in contrasting breeding systems*. University of Chicago press.
17. *Crowcroft P, Rowe FP* (1963) Social organization and territorial behaviour in the wild house mouse (*Mus Musculus* L.) *Proceedings of the Zoological Society of London*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd 140: 517–531. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1963.tb01871.x>
18. *Fang Q, Zhang YH, Shi YL, Zhang JH, Zhang JX* (2016) Individuality and transgenerational inheritance of social



- dominance and sex pheromones in isogenic male mice. *J Exper Zool Part B: Mol Dev Evol* 326: 225–236. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22681>
19. *Kruczek M* (1997) Male rank and female choice in the bank vole, *Clethrionomys glareolus*. *Behav Proc* 40: 171–176. [https://doi.org/10.1016/S0376-6357\(97\)00785-7](https://doi.org/10.1016/S0376-6357(97)00785-7)
  20. *Schwende FJ, Wiesler D, Jorgenson JW, Carmack M, Novotny M* (1986) Urinary volatile constituents of the house mouse, *Mus musculus*, and their endocrine dependency. *J Chem Ecol* 12: 277–296. <https://doi.org/10.1007/bf01045611>
  21. *Schaefer ML, Wongravee K, Holmboe ME, Heinrich NM, Dixon SJ, Zeskind JE, Kulaga HM, Breton RG, Reed RR, Trevejo JM* (2010) Mouse urinary biomarkers provide signatures of maturation, diet, stress level, and diurnal rhythm. *Chem Senses* 35: 459–471. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjq032>
  22. *Liu YJ, Guo HF, Zhang JX, Zhang YH* (2017) Quantitative inheritance of volatile pheromones and darcin and their interaction in olfactory preferences of female mice. *Sci Reports* 7: 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02259-1>
  23. *Khotskina AS, Zavjalov EL, Shnayder EP, Gerlinskaya LA, Maslennikova SO, Petrovskii DV, Baldin MN, Makas AL, Gruznov VM, Troshkov ML, Moshkin MP* (2023) CD-1 mice females recognize male reproductive success via volatile organic compounds in urine. *Vavilov J Gen Breeding* 27: 480–487. <https://doi.org/10.18699/VJGB-23-58>
  24. *Cora MC, Kooistra L, Travlos G* (2015) Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicol Pathol* 43: 776–793. <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>
  25. *Gromski PS, Muhamadali H, Ellis DI, Xu Y, Correa E, Turner ML, Goodacre R* (2015) A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis—a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Analyt Chimica Acta* 879: 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.012>
  26. *Breton RG, Lloyd GR* (2014) Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *J Chemometrics* 28: 213–225. <https://doi.org/10.1002/cem.2609>
  27. *Hurst JL, Beynon R* (2013) Rodent urinary proteins: genetic identity signals and pheromones. *Chemical signals in vertebrates* 12. Springer, New York, NY: 117–133. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5927-9\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5927-9_9)
  28. *Willse A, Belcher AM, Preti G, Wahl JH, Thresher M, Yang P, Yamazaki K, Beauchamp GK* (2005) Identification of major histocompatibility complex-regulated body odors by statistical analysis of a comparative gas chromatography/mass spectrometry experiment. *Analytical Chemistry* 77: 2348–2361. <https://doi.org/10.1021/ac048711t>
  29. *Novotny MV, Soini HA, Koyama S, Wiesler D, Bruce KE, Penn DJ* (2007) Chemical identification of MHC-influenced volatile compounds in mouse urine. I: Quantitative proportions of major chemosignals. *J Chem Ecol* 33: 417–434. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9230-9>
  30. *Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM* (2000) M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164: 6166–6173. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>
  31. *Pellegrini A, Guiñazú N, Aoki MP, Calero IC, Carrera-Silva EA, Girones N, Fresno M, Gea S* (200) Spleen B cells from BALB/c are more prone to activation than spleen B cells from C57BL/6 mice during a secondary immune response to cruzipain. *Int Immunol* 19: 1395–1402. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxm107>
  32. *Babochkina TI, Gerlinskaya LA, Anisimova MV, Kontsevaya GV, Feofanova NA, Stanova AK, Moshkin MP, Moshkin YM* (2022) Mother–Fetus Immune Cross-Talk Coordinates “Extrinsic”/“Intrinsic” Embryo Gene Expression Noise and Growth Stability. *Int J Mol Sci* 23: 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms232012467>
  33. *Lee AW, Emsley JG, Brown RE, Hagg T* (2003) Marked differences in olfactory sensitivity and apparent speed of forebrain neuroblast migration in three inbred strains of mice. *Neuroscience* 118: 263–270. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00950-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00950-8)
  34. *Roberts SA, Prescott MC, Davidson AJ, McLean L, Beynon RJ, Hurst JL* (2018) Individual odour signatures that mice learn are shaped by involatile major urinary proteins (MUPs). *BMC Biol* 16: 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0512-9>
  35. *Moshkin MP, Kondratiuk EI, Litvinova EA, Gerlinskaya LA* (2010) The activation of specific immunity in male mice stimulates fertility of their breeding partners: The phenomenon of Lot's daughters. *Zhurnal obshchei biologii* 71: 425–435. <https://doi.org/10.1134/S2079086411010063>
  36. *Герлинская ЛА, Фролова ЮА, Кондратюк ЕЮ, Мошкин МП* (2007) Затраты на маркировку и репродуктивный успех у самцов мышей лабораторной линии ICR. *Журн общ биол* 68: 296–306. [*Gerlinskaya LA, Frolova YUA, Kondratiuk YEYU, Moshkin MP* (2007) Zatraty na markirovku i reproduktivnyy uspek u samtsov myshey laboratornoy linii ICR. *Zhurn obshch biol* 68: 296–306]
  37. *Marshall DJ, Uller T* (2007) When is a maternal effect adaptive? *Oikos* 116: 1957–1963. <https://doi.org/10.1111/j.2007.0030-1299.16203.x>
  38. *Wang X, Miller DC, Harman R, Antczak DF, Clark AG* (2013) Paternally expressed genes predominate in the placenta. *Proc Nat Acad Sci* 110: 10705–10710. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308998111>
  39. *Denomme MM, Parks JC, McCallie BR, McCubbin NI, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG* (2020) Advanced paternal age directly impacts mouse embryonic placental imprintin. *PLoS One* 15: 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229904>

## FEMALE BALB/C MICE PREFER THE ODOR OF MATES PRODUCING FEWER PROGENY

A. S. Khotskina<sup>a, #</sup>, Y. V. Patrushev<sup>b</sup>, D. I. Yusupova<sup>a</sup>, L. A. Gerlinskaya<sup>a</sup>,  
S. O. Maslennikova<sup>a</sup>, D. V. Petrovskii<sup>a</sup>, M. P. Moshkin<sup>a</sup> and E. L. Zavjalov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics Siberian Branch  
of the Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia*

<sup>b</sup> *The Federal Research Center Boreskov Institute of Catalysis of the Siberian Branch  
of the Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia*

<sup>#</sup> *e-mail: dotcenko@bionet.nsc.ru.*

Mate choice is the very important part of sexual selection. It is known that free mate choice is to provide the most viable offspring are born. Researches on different animal species found that viability from introduction to sexual maturity is significantly higher in individuals born in crossbreeding in accordance with free behavioral mate choice, compared to that in crossbreeding against the mate choice. Making the choice, the female may rely on visual, vocal or olfactory signals of male. Most of experiments evaluating sexual choice allowing interactions with the animal, making it impossible to determine the specific contribution of each separate signal. Odor play a crucial role in intra-specific communication in rodents. Individuals are able to recognize sex, reproductive status, genotype, and diet and health condition conspecifics by odor. However, very few articles unite olfactory signals from the male to information about his paternal effects. In our research, we mated a male with two females. The number of live embryos, their weight and the weight of fetal placentas evaluated reproductive success of males. Naive females in olfactory tests then evaluated the volatile urine fraction of the males. Male urine samples were also analyzed using chromatography-mass spectrometry analysis. In result, the naive BALB/c females prefer males with low number of fetus in the litter compared to males with high number of fetus in the litter. Instrumental method of analysis approved the opportunity to differentiate between the groups of males. Other pregnancy parameters did not affect naive females' preference for male urine samples.

*Keywords:* Olfactory preference, mating choice, olfactory test, strain of mice BALB/c, strain of mice C57BL/6